

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND
GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. DR. T.E. REICHERT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IDENTIFIKATION DES ORALEN
PLATTENEPITHELKARZINOMS
UND SEINER VORLÄUFERLÄSIONEN
MITTELS KONVENTIONELLER
BÜRSTENBIOPSIE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Markus Manuel Hullmann

2010

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND
GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. DR. T.E. REICHERT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IDENTIFIKATION DES ORALEN
PLATTENEPITHELKARZINOMS
UND SEINER VORLÄUFERLÄSIONEN
MITTELS KONVENTIONELLER
BÜRSTENBIOPSIE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Markus Manuel Hullmann

2010

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Peter Proff

Tag der mündlichen Prüfung:

13.09.2010

Für meine geliebte Nina-Kristin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
AgNOR	Antigen nuclear organizer region
Cis	Carcinoma in situ
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
Ln-5	Laminin-5
SIN	Squamöse intraepitheliale Neoplasie
Tn-C	Tenascin-C
z.B.	zum Beispiel

GLOSSAR

Akridinorange	Fluorochrom zum Anfärben der DNA
DNA-Ploidie	charakterisiert den DNA Gehalt einer Zelle
Image-Zytometrie	Verfahren zur Bestimmung des DNA-Gehaltes einzelner Zellkerne und von DNA-Histogrammen ganzer Zellpopulationen
Laminin-5	extrazelluläres Matrixprotein, verantwortlich für die Zellhaftung an der Basalmembran Mikrosatelliten nicht proteinkodierende Abschnitte der DNA
Negativer Vorhersagewert	statistischer Parameter, der beschreibt, ob bei einem negativen Testwert die Person nicht erkrankt ist
Oral CDx [®]	computergestütztes Analyseverfahren zur Diagnose oraler Bürstenbiopate
P53	Gen zur Regulierung des automatisierten Zelltodes bei genetischen Defekten einer Zelle; bei Defekt dieses Gens, können schadhafte Zellen immortalisiert werden
Positiver Vorhersagewert	statistischer Parameter, der beschreibt, ob bei einem positiven Testwert die Person tatsächlich erkrankt ist
Sensitivität	statistischer Parameter, der beschreibt, ob eine erkrankte Person ein positives Testergebnis erhält
Spezifität	statistischer Parameter, der beschreibt, ob eine gesunde Person ein negatives Testergebnis erhält

Tenascin-C	extrazelluläres Glykoprotein. Verantwortlich für Zellbindung und Zellwanderung
Transformationszone	Epidermisierungszone im Bereich des äußeren Muttermundes, an dem Zylinderepithel der Portio auf Plattenepithel trifft
Zytokeratin	ist über die Bildung intermediärer Filamente an der Ausbildung des zellulären Verbundes beteiligt

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Histopathologische Einteilung der Vorläuferläsionen oraler Plattenepithelkarzinome nach der WHO-Klassifikation 2005	13
1.2 Weitere nicht invasive Verfahren zum Monitoring der Mundhöhle.....	18
1.2.1 Toluidinblau	18
1.2.2 Photodynamische Diagnose (PDD, Fluoreszenzdiagnostik).....	19
1.2.3 Autofluoreszenz	21
1.3 Orale Exfoliativzytologie	24
1.4 Methodische Entwicklung	27
1.5 Erfahrungen anderer Fachrichtungen mit der Bürstenzytologie	34
1.6 Orale Bürstenbiopsie	36
2. MATERIAL UND METHODE	39
2.1 Patienten	39
2.2 Materialgewinnung	40
2.2.1 Zytologie	40
2.3 Auswertungskriterien.....	43
2.3.1 Histologie.....	43
2.3.2 Zytologie.....	44
2.4 Statistik	46
2.5 Literaturrecherche	48
3. ERGEBNISSE.....	49
3.1. Histologie.....	49
3.2. Zytologie	51
4. DISKUSSION	55
4.1 Diskussion der Methode	55

4.2 Diskussion der Ergebnisse	58
4.3 Diskussion ergänzender Verfahren zur konventionellen Bürsten-biopsie	61
4.3.1 DNA-Image-zytometrisch unterstützte Bürstenbiopsie.....	61
4.3.2 Computerunterstützte Bildanalyse des Bürstenbiopsates (OralCDx®).....	62
4.3.3 Immunzytochemisch erweiterte Bürstenbiopsie	63
4.3.4 Dünnschichtzytologie („liquid-based cytology“)	65
4.3.5 Molekulare Analyse.....	66
 5. SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	 73
 6. ZUSAMMENFASSUNG.....	 75
 7. LITERATURVERZEICHNIS	 77
 DANKSAGUNGEN	 103
 LEBENS LAUF	 105

1. EINLEITUNG

Orales Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle stellt eine maligne Neoplasie der Mundschleimhaut dar. Die jährliche Neuerkrankungsrate für orale Plattenepithelkarzinome wird für Deutschland mit etwa 4000 bis 10000 angegeben [Howaldt et al., 2000]. In den Vereinigten Staaten wurde die Neuerkrankungsrate 2002 auf 28900 Fälle geschätzt [Neville and Day, 2002]. Die Mundhöhlenkarzinome gehören zu den Kopf-Hals-Tumoren, die weltweit an sechster Stelle in der Liste der häufigsten malignen Tumoren stehen und für etwa 350000 Krebstodesfälle pro Jahr verantwortlich gemacht werden [Argiris et al., 2008]. Der Zeitpunkt der Diagnosestellung beeinflusst die Prognose erheblich und entscheidet wesentlich über den Erfolg einer möglichen Therapie [Kowalski und Carvalho, 2001]. Aufgrund der fehlenden Schmerzsymptomatik im Frühstadium werden orale Plattenepithelkarzinome und ihre Vorläuferläsionen nicht oder nur als Zufallsbefund bei der oralen Inspektion im Rahmen der (zahn-) ärztlichen Routineuntersuchung entdeckt [Guggenheimer et al., 1989]. Eine Diagnoseverschleppung von mehr als vier Wochen bedingt eine signifikant schlechtere Prognose [Kowalski and Carvalho, 2001]. Während Tumoren in frühen Tumorstadien häufig rein chirurgisch und mit geringen Einschränkungen der Lebensqualität therapiert werden können, erfordern fortgeschrittene Mundhöhlenkarzinome häufig multimodale und aggressivere Therapiemaßnahmen, die zu erheblichen Folgen für die betroffenen Patienten führen können. Die Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten in den vergangenen 20 Jahren führte im gleichen Zeitraum nur zu einem geringen Zugewinn bei der 5-Jahres-Überlebensrate oraler Plattenepithelkarzinome [Bray et al., 1995; Adam, 2003; Argiris et al., 2008; Böcking et

al., 2004]. Wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist die Verschleppung der Diagnose zum einen durch den verspäteten Arztbesuch des Patienten [Pape, 1981; Pape und Gerlach, 1995], zum anderen in der späten Diagnosestellung durch den erstbehandelnden Arzt [Guggenheimer et al., 1989]. Erst in fortgeschrittenem Tumorstadium treten Symptome wie Schmerz, Blutung, Ulzeration und funktionelle Beeinträchtigungen wie Schluck- und Sprechbeschwerden auf. Daher erfolgt die Vorstellung des Patienten beim Arzt erstspät [Schleier et al., 2002]. Die Diagnoseverschleppung durch den Arzt wird mit durchschnittlich 2-4 Monaten angegeben und wurde als negativer Prognosefaktor in Studien bestätigt [Allison et al., 1998; Amir et al., 1999; Kowalski und Carvalho, 2001; Teppo et al., 2003]. Weil das klinische Bild oraler Veränderungen trotz unterschiedlicher Ursachen ähnlich ist, steht der Kliniker oftmals vor der schwierigen Unterscheidung, ob eine harmlos scheinende Läsion Zeichen eines malignen Geschehens ist [Silverman, 1988]. Zu oft wird die Diagnose des Karzinoms durch den Behandler zu spät gestellt [Allison et al., 1998; Wildt et al., 1995]. Systematische Früherkennung bleibt die aussichtsreichste Strategie zur Verminderung der individuellen Krankheitsbelastungen [Zavras et al., 2002].

Präkursorläsionen

Obwohl orale Plattenepithelkarzinome grundsätzlich auch in der klinisch gesund erscheinenden Mundschleimhaut entstehen können, bildet sich die große Mehrzahl auf dem Boden langfristig bestehender und klinisch erkennbarer Vorläuferläsionen [Forastiere et al., 2001; Scheifele und Reichart, 2003]. Diese Vorläuferläsionen gehen überwiegend mit Verhornungsstörungen der Mundschleimhaut einher und erscheinen unter dem klinischen Bild der Leukoplakien oder Erythroplakien. Erhebungen für die

Bundesrepublik Deutschland gehen von einer Leukoplakie-Inzidenz um 1,8 % in den alten Bundesländern und um 0,9 % in den neuen Bundesländern aus [Reichart, 2000]. Da sich hinter dem rein deskriptiven Begriff der Leukoplakie kein einheitliches Krankheitsbild verbirgt, ist die Häufigkeit der malignen Transformation in hohem Maße unterschiedlich und wird studienabhängig in einem Spektrum von 0,6 bis 18 % angegeben [Reibel, 2003; Greenspan and Jordan, 2004]. Inhomogene Leukoplakien besitzen im Vergleich zur homogenen Leukoplakie ein vier bis fünfmal erhöhtes Entartungsrisiko [Silverman et al., 1984]. Doch erfordern auch homogene Leukoplakien aufgrund einer Transformationsrate von bis zu 5 % [Burkhardt und Maerker, 1981; Silverman et al., 1984; Lind, 1987] eine engmaschige Nachsorge. Die Transformationsraten von Erythroplakien und Leukoplakien mit erosiven Anteilen liegen deutlich höher und erreichen bis zu 50 % [Reichart and Philipsen, 2005].



a

b

Abbildung 1: Invasives Plattenepithelkarzinom.

a Invasives Plattenepithelkarzinom auf dem Boden einer homogenen Leukoplakie.

b Invasives Plattenepithelkarzinom auf dem Boden einer inhomogenen Leukoplakie.

Bei den Erkrankungsbildern, die mit einem erhöhten Entartungsrisiko einhergehen, werden aus systematischen Gründen „Vorläuferläsionen“ (Synonyme: Präkanzerosen, Präkursorläsionen) von „prämaligen Konditionen“ (Synonyme: potentiell maligne Bedingungen, präkanzeröse Konditionen) unterschieden [Reichart, 2007].

Unter dem Begriff der „Vorläuferläsion“ wird dabei die konkrete Manifestation an umschriebener Stelle oder an mehreren Stellen der Mundschleimhaut verstanden. Im Gegensatz dazu bezeichnet der Begriff der „prämaligen Kondition“ eine Grunderkrankung, die durch eine generell erhöhte Entartungstendenz der Mundschleimhaut charakterisiert ist.

Die klinisch bedeutsamen „Vorläuferläsionen“ in den industrialisierten Ländern sind die Erythroplakie und die Leukoplakie [Scheifele und Reichart, 2003], die relevante „prämalige Kondition“ stellt die Lichenerkrankung der Mundschleimhaut dar. Zahlreiche andere Krankheitsbilder gehören ebenfalls zur Gruppe der „prämaligen Konditionen“ (Eisenmangelanämie, orale submuköse Fibrose, Syphilis, Xeroderma pigmentosum, Lupus erythematoses, Epidermolysis bullosa dystrophicans), spielen in der Bevölkerung westlicher Industrieländer aber eine untergeordnete Rolle [El Naggar und Reichart, 2005].

Da der Begriff „Präkanzerose“ in der Vergangenheit recht häufig für alle oben genannten Krankheitsbilder verwendet wurde, sollte dieser Begriff zugunsten der Bezeichnungen Vorläuferläsionen verlassen werden. Im weiteren Text wird daher einheitlich von Vorläuferläsionen gesprochen.

Klinisches Erscheinungsbild der Vorläuferläsionen

Vorläuferläsionen bezeichnen einen konkreten Schleimhautbezirk mit morphologisch verändertem Gewebe, in dem das Auftreten eines Karzinoms wahrscheinlicher ist als in normaler Mundschleimhaut. Sie werden rein morphologisch-deskriptiv in homogene und inhomogene Leukoplakie, verruköse Leukoplakie, proliferative verruköse Leukoplakie, Erythroplakie sowie Erythroleukoplakie unterteilt.

Leukoplakie

Die Leukoplakie wurde von der WHO als eine weiße, nicht abwischbare Mundschleimhautveränderung definiert, die klinisch und pathologisch keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann. Entsprechend gibt es keine histopathologische Definition der Leukoplakie. Der Begriff Leukoplakie sollte daher nur als klinische Diagnose Verwendung finden. Orale Leukoplakien können im Bereich der gesamten Mundschleimhaut auftreten, finden sich bevorzugt aber im Bereich der bukkalen Mukosa, im Bereich des Mundbodens, an der Gingiva und im Zungenrandbereich.

Im Laufe der Zeit sind verschiedene Klassifikationen für die Beschreibung der Leukoplakien der Mundhöhle vorgeschlagen worden, in der Regel mit dem Ziel, die Gefahr einer malignen Transformation näherungsweise anhand des klinischen Bildes voraussagen zu können. Gebräuchlich ist beispielsweise die Beschreibung als plane, verruköse oder erosive Leukoplakie mit ansteigendem Risiko der malignen Transformation. Ein anderes Konzept unterscheidet die homogene Leukoplakie von der inhomogenen Leukoplakie (mit granulär oder nodulär veränderter Oberfläche) (Abb. 2 a, b und 3 a, b).

Erythroleukoplakie

Die Erythroleukoplakie wird, je nach Klassifikation, den erosiven oder inhomogenen Leukoplakien zugerechnet. Neben weißlich veränderten Arealen finden sich rote Schleimhautbezirke (Abb. 3). Das gesamte klinische Erscheinungsbild ist sehr viel unruhiger als das der planen oder homogenen Leukoplakie und das Risiko der malignen Entartung wird deutlich höher eingestuft [Holmstrup et al., 2006; Neville and Day, 2002].

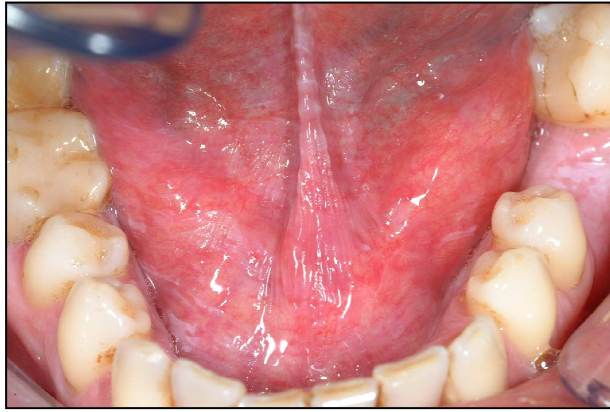
Erythroplakie

Ähnlich der Definition der Leukoplakie stellt auch der Begriff der Erythroplakie die klinische Beschreibung einer rötlichen Mundschleimhautveränderung dar, die keiner anderen Erkrankung zu geordnet werden kann. Bevorzugte Lokalisation der Erythroplakie ist der Mundboden, der Zungenrand, die Retromolarregion und der weiche Gaumen (Abb. 4). In der Regel ist die Läsion gut von der physiologischen Mukosa abgrenzbar, in manchen Fällen ist ein fließender Übergang vorhanden. Zumeist ist die Erythroplakie schmerzlos. Gelegentlich wird jedoch ein Brennen angegeben.

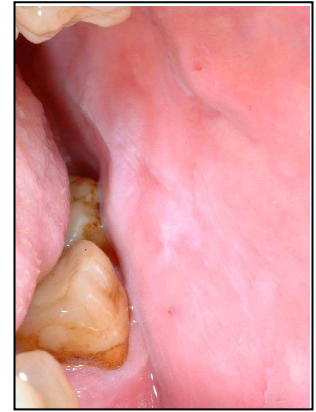
Proliferative verruköse Leukoplakie

Eine besondere Form der Leukoplakie stellt die proliferative verruköse Leukoplakie dar, die regelmäßig als Vorläufer des verrukösen Karzinoms und schließlich des oralen Plattenepithelkarzinoms gesehen wird [Batsakis et al., 1999] (Abb. 5 a, b). In der Literatur werden vier Stadien der Entwicklung einer proliferativen verrukösen Leukoplakie hin zum Karzinom genannt: Hyperkeratose ohne Entwicklung einer

epithelialen Dysplasie, verruköse Hyperplasie, verruköses Karzinom, orales Plattenepithelkarzinom [Murray und Batsakis, 1994; Batsakis et al., 1999]. In frühen Stadien fehlen dem hyperplastischen Epithel die typischen Kriterien der Dysplasie mit signifikanten Veränderungen der Zellarchitektur und –morphologie, was zur Unterschätzung der Läsionen führen kann [van der Waal und Reichart, 2007]. Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit der Transformation in ein verruköses Karzinom, die in der Literatur mit bis zu 70% angegeben wird [Silverman und Gorsky, 1997], und der erhöhten Aggressivität im Vergleich zu anderen Formen der Leukoplakie [Morton et al., 2007], bedarf sie einer raschen chirurgischer Intervention [El Naggar und Reichart, 2005]. Es wird empfohlen, die proliferative verruköse Leukoplakie analog dem Carcinoma in situ zu behandeln [Reichart und Philipsen, 2003; El Naggar und Reichart, 2005]. Die proliferative verruköse Leukoplakie neigt zur multifokalen Ausbreitung und zum Wiederauftreten nach Therapie [Krahl et al., 2008].



a

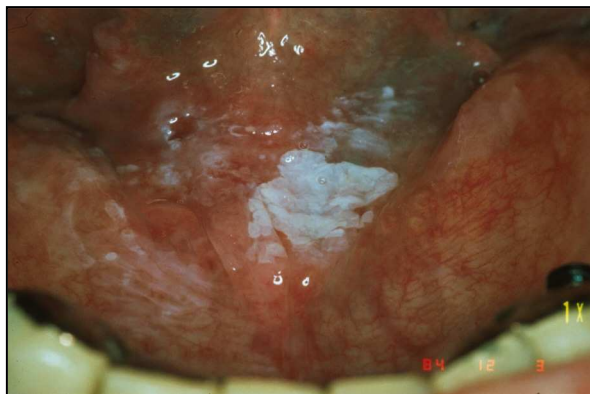


b

Abbildung 2: Homogene Leukoplakie.

a Typisches klinisches Erscheinungsbild im Mundboden.

b Flächiger Befund in der linken Wange.



a



b

Abbildung 3: Inhomogene Leukoplakie.

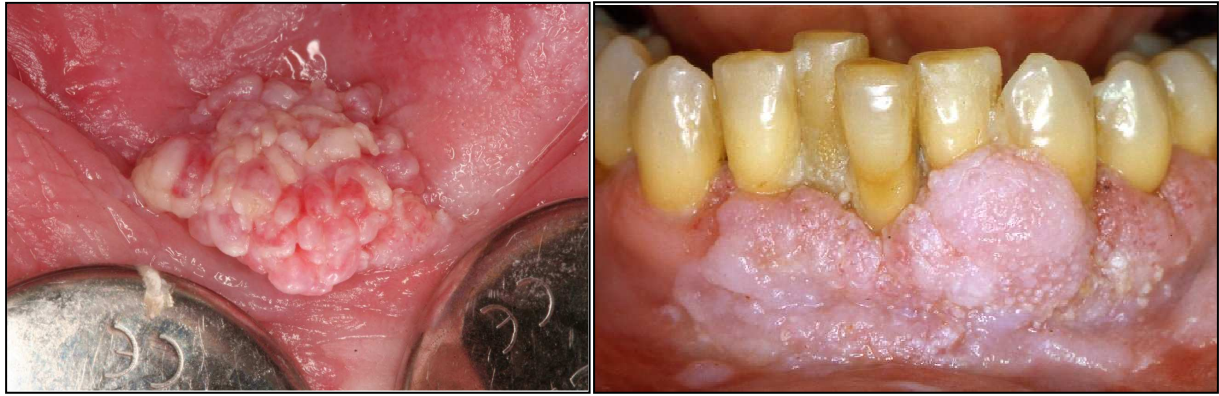
a Lokalisation im anterioren Mundboden links ausgeprägter als rechts.

b Ausdehnung über den gesamten anterioren Mundboden beidseits.



Abbildung 4: Erythroplakie:

Flächige Erosionszone der Wangenschleimhaut (Histologisch: Carcinoma in situ, entsprechend SIN III)



a

b

Abbildung 5: Verruköse Mundschleimhautveränderungen.

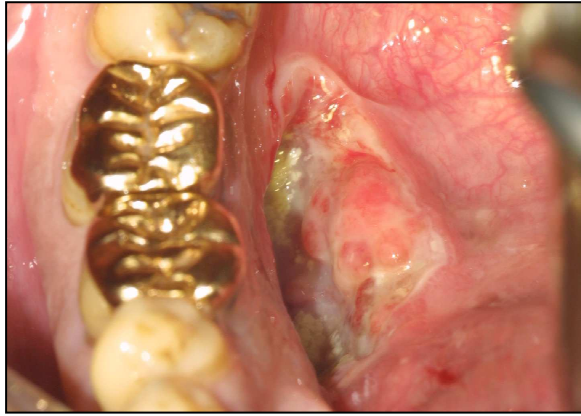
a Verruköse Leukoplakie im Bereich des Unterkiefervestibulums.

b Proliferative verruköse Leukoplakie (PVL) im Bereich des UK Alveolarfortsatzes, diese Sonderform geht mit einem sehr hohen Entartungsrisiko einher.



Abbildung 6: Erythroleukoplakie im Bereich des harten Gaumens.

Zusätzlich liegt bei diesem Patienten im vorderen Gaumengewölbe auch eine Raucher-Leukokeratose vor, d. h. eine reaktive Schleimhautveränderung, die selbst keine Entartungstendenz zeigt



a



b

Abbildung 7: Endophytisches und exophytisches Wachstumsmuster.

a Endophytisch wachsendes Mundbodenkarzinom.

b Exophytisch wachsendes Zungenrandkarzinom.

1.1 Histopathologische Einteilung der Vorläuferläsionen oraler Plattenepithelkarzinome nach der WHO-Klassifikation 2005

Die aktuelle WHO-Klassifikation der oralen Tumoren fasst die präkanzerösen Läsionen des Plattenepithels (Synonyme: Präkanzerosen, Präkursorläsionen Dysplasien, prä maligne Läsionen) unter dem Terminus epitheliale Vorläuferläsionen zusammen. Die epithelialen Vorläuferläsionen werden anhand von histologischen Kriterien der gestörten Plattenepithelarchitektur und der zytologischen Atypie klassifiziert (Tabelle 1) [Gale et al., 2005].

Merkmale der gestörten Plattenepithelarchitektur	Merkmale der zytologischen Atypie
Irreguläre Epithelschichtung	Abnorme Variation der Kerngröße
Verlust der Ausrichtung der Basalzellen	Abnorme Variation der Kernform
Tropfenförmige Reteleisten	Abnorme Variation der Zellgröße
Steigerung der Mitosezahl	Abnorme Variation der Zellform
Vorzeitige Keratinisierung in Einzelzellen (Dyskeratose)	Pathologische Kern-Plasma-Relation, Hyperchromasie der Kerne
Keratinperlen innerhalb der Retezapfen	Atypische Mitosefiguren

Tabelle 1: Histologische Kriterien zur Diagnose epithelialer Präkursorläsionen der Mundhöhle modifiziert nach Gale und Mitarbeitern [Gale et al., 2005]

Im Gegensatz zur bisherigen WHO-Klassifikation werden nun in der aktuellen Nomenklatur drei Typisierungs- und Graduierungssysteme epithelialer Vorläuferläsionen gleichberechtigt nebeneinander geführt (Tabelle 2).

2005 WHO-Klassifikation	Squamöse Intraepitheliale Neubildung (SIN)	Ljubljana Klassifikation Squamöse Intra- epitheliale Läsion (SIL)
Squamöse Hyperplasie	-	Squamöse (einfache) Hyperplasie
Leichte Dysplasie	SIN I	Basale und parabasale Hyperplasie (abnorme Hyperplasie)
Mittelgradige Dysplasie	SIN II	Atypische Hyperplasie (Risikoepithel)
Schwere Dysplasie	SIN III	Atypische Hyperplasie (Risikoepithel)
Carcinoma in situ	SIN III	Carcinoma in situ

Tabelle 2: Gegenüberstellung der aktuellen Klassifikationen der Vorläuferläsionen
modifiziert nach Gale und Mitarbeitern [Gale et al., 2005]

Die gleichrangige Verwendung von drei alternativen Typisierungs- und Graduierungssystemen epithelialer Vorläuferläsionen vereinfacht zwar nicht die Kommunikation, gestattet aber den Konsens, dass die drei alternativen Klassifikationssysteme sowohl in der Mundhöhle, im Oro- und Hypopharynx sowie im Larynx und in der Trachea angewandt werden können.

Die morphologischen Kriterien graduieren das Risiko der malignen Transformation und bestimmen das diagnostisch-therapeutische Konzept. Während squamöse (einfache) Hyperplasie und Basalzell- bzw. Parabasalzellhyperplasie (entspricht leichter Dysplasie bzw. SIN I) noch eine Beobachtungsstrategie erlauben, sollten Läsionen mit einer atypischen Hyperplasie (entspricht einer mittelgradigen bis schweren Dysplasie bzw. SIN II-III) und Carcinoma in situ (SIN III) entfernt werden [Küffer und Lombardi, 2002; Driemel et al., 2006].

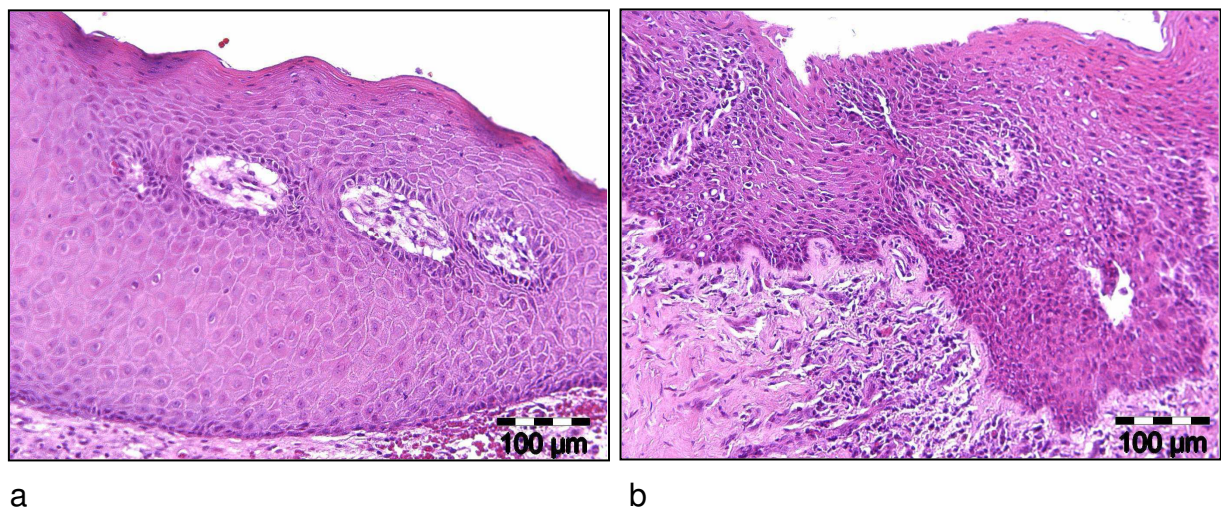
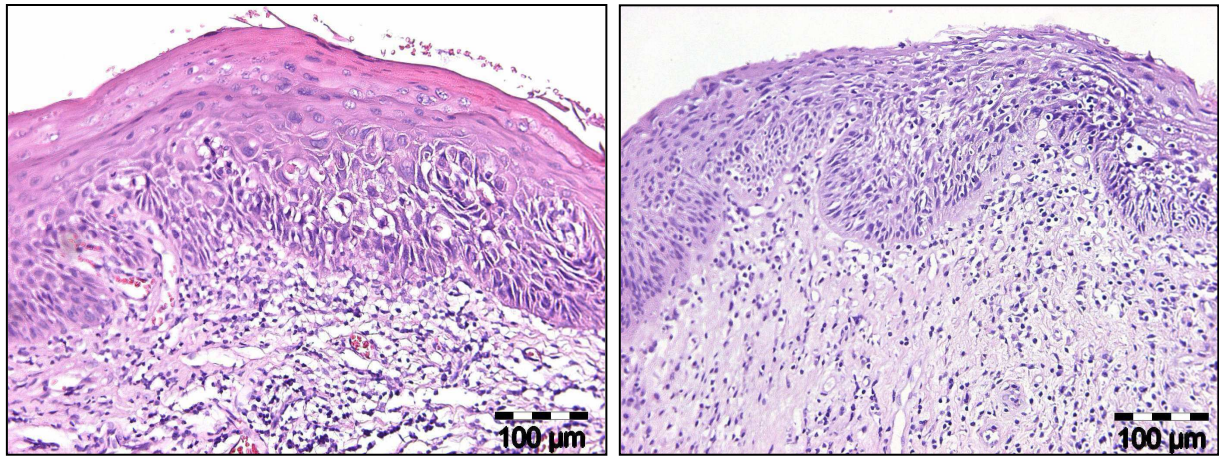


Abbildung 8: Histologisches Bild irregulären Plattenepithels.

a Squamöse Hyperplasie oder leichte Hyperplasie (Fehlen zytologischer und struktureller Atypien, nur Vermehrung der Epithelzellzahl).

b Leichte Dysplasie, SIN I oder abnorme Hyperplasie (Vermehrung der Basalzellen bzw. parabasalen Zellen, nur geringgradige architektonische Alteration des basalen Drittels des Plattenepithels und zytologische Irregularitäten).



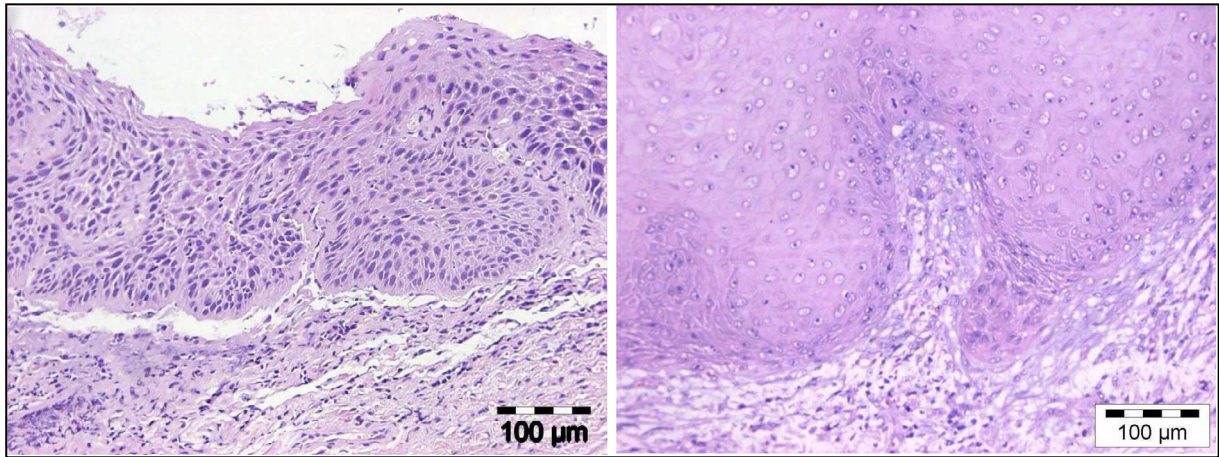
a

b

Abbildung 9: Histologisches Bild irregulären Plattenepithels.

a Mittelgradige Dysplasie, SIN II oder atypische Hyperplasie (bereits gut sichtbare zytologische Irregularitäten und architektonische Alteration bezieht das mittlere Drittel des Epithels mit ein).

b Schwere Dysplasie, SIN III oder atypische Hyperplasie (eindeutige zytologische Atypien, Architekturstörung auch des oberen Drittels des Plattenepithels).



a

b

Abbildung 10: Histologisches Bild irregulären Plattenepithels.

a Carcinoma in situ oder SIN III (architektonisch und zytologisch alle Merkmale des karzinomatösen Plattenepithels mit Ausnahme der Invasion).

b Invasives Plattenepithelkarzinom (Basalmembran durchbrochen).

1.2 Weitere nicht invasive Verfahren zum Monitoring der Mundhöhle

1.2.1 Toluidinblau

Toluidinblau (OraTest[®], OraScan[®], OraScreen[®]) zählt wie die Lugolsche Lösung und Methylenblau zu den absorptiven Farbstoffsubstanzen. Für die Intravitalfärbung wird eine 1 %ige Toluidinblau-Lösung auf die Mundschleimhaut aufgetragen und nach einer ein- bis zweiminütigen Einwirkzeit mit 2 %iger Essigsäure wieder entfernt [Johnson, 1999]. Toluidinblau diffundiert in die Zellen und färbt die Nuklei. Maligne veränderte Schleimhautareale können aufgrund der größeren Kern-Plasma-Relation vom physiologischen Gewebe durch eine intensivere Blaufärbung unterschieden werden [Johnson, 1999; Niebel und Chomet, 1964]. Die Methode soll insbesondere bei Patienten mit starker Exposition zu Risikofaktoren [Mashberg und Samit, 1995] sowohl helfen, sichtbare Läsionen hinsichtlich ihrer Dignität besser einordnen zu können, als auch eine optisch gezielte Biopsie ermöglichen [Epstein et al., 1992]. Da aber auch nicht maligne proliferationsaktive Bezirke ein vergrößertes Kern-Plasma-Verhältnis zeigen können, können bei gutartigen Hyperplasien und entzündlichen Veränderungen falsch positive Ergebnisse auftreten und die Spezifität sowie den positiven Vorhersagewert der Methode begrenzen (Tabelle 3). Demzufolge kann die Methode Vorläuferläsionen nicht zuverlässig detektieren [Onofre et al., 2001] und ihr Nutzen begrenzt sich auf die Identifizierung invasiver, aber noch symptomarmer Karzinome, welche bei einer klinischen Untersuchung eventuell übersehen werden könnten [Ephros et al., 1999; Missmann et al., 2006].

1.2.2 Photodynamische Diagnose (PDD, Fluoreszenzdiagnostik)

In der photodynamischen Diagnose des Mundhöhlenkarzinoms und seiner Präkursorläsionen wird als photosensibilisierender Farbstoff insbesondere 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), die körpereigene Ausgangssubstanz der Häm-Synthese, verwendet. Im Überschuss topisch verabreicht, stimuliert 5-ALA in dysplastischem - und in karzinomatösem Gewebe eine verstärkte Bildung und intrazelluläre Akkumulation von stark fluoreszierendem Protoporphyrin IX, das durch kurzfristige Einwirkung von Licht einer Wellenlänge von 405 nm angeregt wird [Chang und Wilder-Smith, 2005; Leunig et al., 1996]. Die Fluoreszenzbefunde gelten als suspekt und können biopsiert werden. Bei der Detektion oraler Plattenepithelkarzinome zeigt die Methode zwar eine hohe Sensitivität, aber eine eingeschränkte Spezifität (Tabelle 3). Problematisch sind die falsch positiven Befunde insbesondere bei vorbestrahlten Patienten [Betz et al., 2002; Schleier et al., 2002; Zenk et al., 1999], so dass sich die photodynamische Diagnose nicht für die Rezidiv- bzw. Zweittumordiagnostik bei zuvor radiierten Patienten eignet [Zenk et al., 1999]. Da verschiedene Bakterienstämme der Mundhöhle bei Inkubation von 5-ALA ebenfalls Protoporphyrin IX bilden [Doss und Philipp-Dormostro, 1973], sind im Rahmen der photodynamischen Diagnose professionelle Hygienemaßnahmen zur Erhöhung der Spezifität notwendig [Schleier et al., 2002]. Ein Intervall von ungefähr einer Stunde zwischen professionellen Hygienemaßnahmen und der Applikation des Photosensibilisators 5-ALA sowie von etwa drei Stunden zwischen Applikation des Photosensibilisators 5-ALA und der Bildung einer für die Fluoreszenzmessung ausreichenden Menge Protoporphyrin IX [Schleier et al., 2002] schränken die Praktikabilität der Photodynamischen Diagnose in der ambulanten Tumovor- und nachsorge stark ein. Da bereits geringe Mengen Glukose die Bildung von Protoporphyrin IX beeinflussen, wird zudem eine strikte Nahrungskarenz während dieses Zeitraumes von 4 Stunden notwendig [Zenk et al.,

1999]. Dieses verlangt ein stringentes Patientenmanagement und ist unter Berücksichtigung der begrenzten Compliance gerade der Patienten mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Mundhöhlenkarzinoms schwierig zu realisieren.

1.2.3 Autofluoreszenz

Autofluoreszenz bezeichnet die biologische Eigenschaft von Gewebe, aufgrund endogener Fluorophore, wie z.B. Flavin, Tryptophan, Elastin und Kollagen, bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zu fluoreszieren [Betz et al., 1994; Policard, 1924]. Während in maligne transformierten Zellen der anaerobe Glykolyse-Zyklus dominiert, findet in normalen Zellen vornehmlich der aerobe Glykolyse-Zyklus statt. Das Mononukleotid Flavin fungiert im aeroben Glykolyse-Zyklus als Coenzym, während es im aeroben Glykolyse-Zyklus fehlt. Wird es mit blauem Licht stimuliert, fluoresziert Flavin grün und differenziert so das gesunde vom karzinomatösen Gewebe, welches sich dunkel darstellt [Baletic, 2004]. Im Gegensatz zur Photodynamischen Diagnose erfordert die Autofluoreszenz keine medikamentöse Gabe von Photosensibilisatoren. Die Pharmakokinetik und die spezifischen Eigenschaften der Photosensibilisatoren wie Gewebespezifität, Toxizität bzw. Dunkeltoxizität, Singulett-sauerstoffproduktion, Teratogenität und Mutagenität müssen nicht berücksichtigt werden. Die zeitaufwendige Vorbereitung der Photodynamischen Diagnose entfällt. Ihr Stellenwert in der Diagnostik epithelialer Tumoren findet sich in den unterschiedlichen medizinischen Teilbereichen in der Erprobung [Baletic, 2004; DaCosta et al., 2005]. Da neben der malignen Transformation auch andere pathologische Prozesse, wie z. B. Entzündungen und Ischämie, den metabolischen Zustand einer Zelle und somit den oxidativen Zustand des Gewebes beeinflussen, sind falsch positive Fälle nicht sicher auszuschließen.

Autor		Läsionen	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Positiver Vorher- sagewert [%]	Negativer Vorher- sagewert [%]
Toluidinblaulösung						
Portugal et al. (1996)		50	100	50	86	100
Epstein et al. (1997)		81	100	52	51	100
Onofre et al. (2001)		50	77	67	43	89
Ram and Siar (2005)		46	70	25	86	11
Gandolfo et al. (2006)		18	100	56	69	100
Photodynamische Diagnose						
Leunig et al. (2000)		58	99	60	77	97
Schleier et al. (2002)		198	96	73	88	93
Sharwani et al. (2006)		71	84	89	87	87

Tabelle 3: Ergebnisse mittels Toluidinblaufärbung und photodynamischer Diagnose

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass trotz der Verbesserungen hinsichtlich Entnahmetechnik und Auswertungsmethodik, zytologisch morphologische Untersuchungsverfahren und der oben genannten, ergänzenden Verfahren die Bürstenbiopsie bislang nicht „zum Ausschluss“ von Malignität bei klinisch suspekten Läsionen verwendet werden sollte. Sie stellt vielmehr eine ergänzende, „absichernde“ Strategie dar, die frühzeitig „Hinweise“ auf die neoplastische Natur einer Mundschleimhautläsion geben kann [Eisen, 2002, 2005; Driemel et al., 2007; Kosicki et al., 2007].

Sowohl bei positivem Befund in der Bürstenzytologie als auch bei einer trotz negativem Befund in der Bürstenzytologie fortschreitenden Läsion ist eine klassische Skalpellbiopsie zwingend indiziert [Driemel et al., 2005, 2007; Burkhardt et al., 2006]. Die histopathologische Begutachtung bleibt daher weiterhin der Goldstandard in der definitiven Diagnostik maligner oraler Läsionen [Suhr et al., 2000; Hullmann et al. 2007].

1.3 Orale Exfoliativzytologie

Erste Ansätze zur zytologischen Befundung maligner Prozesse des Oropharynx lassen sich bereits in der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts bei Beale [Beale, 1860] finden, der die natürliche Exfoliation von Zellen aus dem Sputum zum Nachweis von Malignomen nutzte. Achtzig Jahre später erfolgten deskriptive Analysen der Zellstruktur [Weinmann, 1940] und – beeinflusst von gynäkologischen Untersuchungen – Analysen einer zyklusabhängigen Zellmorphologie an oralen Abstrichpräparaten [Brandenburg und Grulms, 1956; Ziskin et al., 1948; Ziskin und Moulton, 1948].

Einen neuen Impuls erhielt die zytologische Malignomdiagnostik durch die Arbeiten von Papanicolaou und Traut [Papanicolaou, 1942; Papanicolaou und Traut, 1943] (Abbildung 11). Ihnen gelang durch färberische Aufarbeitung gynäkologischer Abstriche der Nachweis maligner Veränderungen der Zervixschleimhaut. Morrison et al. [Morrison et al., 1949] übertrugen die Methodik nach Papanicolaou auf Karzinome des Nasopharynx, gefolgt von Montgomery und von Haam [Montgomery und von Haam, 1951], die als Erste zytologische Präparate zur Diagnose von Mundschleimhautveränderungen verwendeten. Sekundär wurde die potenzielle zytologische Nachweisbarkeit oraler epithelialer Tumoren tierexperimentell belegt [Camilleri und Smith, 1964; Hanks et al., 1969; Salley, 1954; Stahl, 1963] (Tabelle 4).

Jahr der Publikation	Autor	Thematik der Publikation
1860	Beale	Nachweis von Karzinomen des Pharynx durch zytologische Sputumanalyse
1940	Weinmann	Untersuchung des Keratinisierungsgrades der oralen Mukosa durch Abstriche
1941	Ziskin et al.	Untersuchung der Zyklusabhängigkeit der Mundschleimhaut
1942	Papanicolaou	Färberische Aufarbeitung vaginaler Abstriche
1943	Papanicolaou and Traut	Nachweis von Uterusmalignomen durch vaginale Abstriche
1949	Morrison et al.	Zytologischer Nachweis von Malignomen des Nasopharynx

Tabelle 4: Wichtige Schritte in der Entwicklung der oralen Zytologie



Abbildung 11: George Nicolas Papanicolaou, Pathologe und Anatom

* 13. Mai 1883 in Kymi, Griechenland, † 19. Februar 1962 in New York, USA

Studierte bis 1907 Medizin an der Nationalen und Kapodistrias Universität in Athen und promovierte 1910 an der Ludwigs-Maximilian-Universität in München. Seit 1947 war er Professor und Leiter des Department of Clinical Anatomy der Cornell University in New York. Mit der von ihm entwickelten Spezialfärbung gelang es, zytologische Abstriche der Gebärmutter zu klassifizieren, und bedeutende Fortschritte in der Früherkennung des Cervixkarzinoms zu machen. Dank der verbesserten Diagnostik konnte die Radikalität der damaligen operativen Therapie reduziert werden. Seine Arbeiten gaben einen wichtigen Impuls zur Etablierung der zytologischen Diagnostik in der Mundhöhle.

1.4 Methodische Entwicklung

Erste methodische Modifikationen sollten die Qualität und damit die Interpretierbarkeit des zytologischen Abstrichs erhöhen. So wurden Versuche unternommen, die Aufnahme atypischer Zellen, deren flächige und dünnschichtige Verteilung auf einem geeigneten Trägermaterial sowie deren Aufbereitung durch Fixation und Färbung zu optimieren. Dies führte zu einer Veränderung der Entnahmemedien mit dem Einsatz von Holzspateln, Schwämmchen, Watteträgern, Metallspateln und Metallküretten (Tabelle 5). Aufgeraute Objektträger wurden als Trägermaterialien empfohlen [King, 1963]. Neben der Zytofärbung nach Papanicolaou wurden jetzt Mayers Hämalanlösung und HE-Färbungen verwendet [Cawson, 1960; Gardner, 1965]. Hierbei zeigte sich die Befundung nicht ulzerierender bzw. hyperkeratotischer Schleimhautläsionen problematisch. Eine Gewinnung maligne transformierter Zellen war durch einen einfachen Abstrich nicht möglich. Deshalb wurde die Abtragung keratotischer Schichten vor dem eigentlichen Abstrich [Sandler, 1964] bzw. die Anwendung von scharfen Löffeln als sog. Abstrichkürettage [Dumbach et al., 1981] vorgeschlagen. Der Vorteil der minimalen Invasivität gegenüber der Skalpelliopsie ging dadurch verloren (Tabelle 6). Als weiterer Schritt wurde versucht, die orale Zytologie – wie in der Gynäkologie – in die Vorsorgeuntersuchung und Früherkennung von Mundhöhlenkarzinomen zu integrieren [Sandler, 1962]. Eine einfache Übertragung der vaginalen Situation auf die orale Mundschleimhaut erwies sich jedoch aus folgenden Gründen als nicht möglich:

1. Abstriche können nicht die gesamte Mundschleimhaut erfassen. Sowohl räumliche Struktur als auch die größere Fläche stehen dem entgegen.

2. Es fehlt die in der Zervix zu findende Transformationszone, in der atypische Zellen frühzeitig an die Oberfläche gelangen.
3. Eine Gewinnung von Zellen aus tieferen Zellschichten des Plattenepithels ist ohne speziellen instrumentellen Aufwand nicht möglich [Pape, 1972; Sandler, 1964].

Die orale Zytologie beschränkte sich daher auf die Abklärung der Dignität sichtbarer mukosaler Läsionen und wurde von verschiedenen Autoren lediglich als ein ergänzendes Verfahren zur Histologie angesehen [Becker, 1966; Gardner, 1965; Tiecke und Blozis, 1966].

Ergänzend zur lichtmikroskopischen Analyse der Zellmorphologie wurden zunächst in der gynäkologischen [Bertalanffy, 1959; Bertalanffy und Bertalanffy, 1961], später in der oralen Zytodiagnostik [Caulder, 1972; Roth et al., 1972] Bemühungen unternommen, durch Fluoreszenz mit Akridinorange Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt der Zellen zu ziehen. Als optimierte Methode der DNA-Ploidie-Bestimmung wurde die Imagezytometrie vorgeschlagen [Abdel-Salam et al., 1986; Cowpe et al., 1993]. Besondere Berücksichtigung fand die Analyse des Zell- und Kerndurchmessers [Ramaesh und Ratanuga, 1998]. Zur Objektivierung der Abstrichanalyse wurde ein automatisiertes Analysesystem eingeführt [Levine et al., 1998].

Molekularbiologische Ansätze, wie die Mikrosatellitenanalyse, wurden bisher nur in Einzelpublikationen beschrieben [Spafford et al., 2001].

Die methodischen Modifikationen der konventionellen oralen Zytologie werden zusammenfassend in Tabelle 6 chronologisch dargestellt.

Autor (Publikations- datum)	Patienten- zahl	Sensitivität in %	Spezifität in %	positiver prädiktiver Wert	negativer prädiktiver Wert	zur Abstrichge- winnung verwendetes Gerät
Montgomery und von Haam (1951)	15	86,7	-	-	-	Metall- Kunststoffspatel
Pomeranz und Stahl (1953)	8	87,5	-	-	-	-
Wahi und Gupta (1954)	41	100	-	-	-	-
Peters und Rysinghani (1956)	194	95,3	-	-	-	Wattestäbchen
Hopp (1958)	25	96	-	-	-	Wattestäbchen
Sandler et al. (1959)	101	93	91	96	85	Holzspatel
Silverman et al (1958)	19	94,7	-	-	-	-

Cawson (1960)	40	96	100	100	77	Metallspatel
Sandler (1960)	151	89,5	100	100	96,6	Holzspatel
Tiecke und Blozis (1960)	150	86	100	100	93,5	Metallspatel
Umiker et al. (1960)	160	94,3	88,9	94,3	88,9	Holzspatel
Sandler (1962)	208	88,5	-	-	-	Holzspatel
Ingram et al. (1963)	422	87	99	87	99	Kürette
Selbach und von Haam (1963)	93	96,8	-	-	-	Holzspatel
Sandler (1964)	592*	97,5	97,5	97,8	97,1	Holzspatel
Shapiro und Gorlin (1964)	92	77	91	74	93	-
Becker (1966)	70	71,4	-	-	-	-

Gastpar (1966)	85	81	-	-	-	Wattestäbchen
Banoczy † (1969)	195	76,9	-	-	-	Metallspatel
Watanabe (1968)	268*	91,8	-	-	-	-
Shklar et al. (1970)	158	86,1	-	-	-	Holzspatel
Pape (1972)	121	97,5	-	-	-	Metallspatel

Tabelle 5: Orale Zytologie ohne Bürstentechnik an oralen Karzinomen.
Es wurden ausschließlich zytologische Diagnosen mit histologischer Abklärung berücksichtigt. † Untersuchung nur an Leukoplakien durchgeführt. *Untersuchung an verdächtigen Läsionen durchgeführt.

Publikations- Jahr	Autor	Methodik
1951	Gladstone	Abstrich mit Schwämmchen zur Verbesserung der Zellaufnahme
1952	Schneider	färberische Modifikationen
1960	Cawson	färberische Modifikationen
1963	King	Verwendung angerauter Objektträger zur besseren Zellhaftung
1963	Staats und Goldsby	Vergleichende Analyse der Probeentnahme durch Holzspatel oder Metallspatel mit einem Votum für Metallspatel
1964	Sandler	Abtragung keratotischer Schichten vor Probeentnahme durch eine scharfe Kürette

1972	Pape	<p>an den intraoralen Befund angepasstes Vorgehen:</p> <p>Wattestäbchen bei ulzerierenden Läsionen</p> <p>metallener Zementspatel bei einfachen Hautläsionen</p> <p>federnder Holzmetallspatel bei derben Leukoplakien</p>
1981	Dumbach et al.	<p>„Abstrichkürettage“, Erfassung tiefer Hautschichten</p> <p>mittels scharfer Kürette</p>

Tabelle 6: Modifikationen der zytologischen Entnahmetechnik

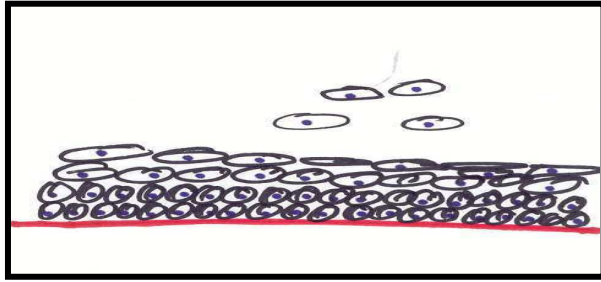
1.5 Erfahrungen anderer Fachrichtungen mit der Bürstenzytologie

Mit Einführung der flexiblen Endoskopie in der gastroenterologischen Diagnostik wurden bis dahin nicht zugängliche Bereiche einer gezielten Zytologie erschlossen. Insbesondere war es nun möglich, in Ösophagus, Magen, Duodenum und Gallengangssystem unter visueller Kontrolle Zellen zu gewinnen [Witte, 1970]. Als praktikabelstes Instrument zur Zellgewinnung über den Instrumentierkanal des Endoskopes etablierte sich eine Zellbürste, mit deren Hilfe eine flächenhafte Erfassung von Schleimhautveränderungen möglich war [Witte, 1973]. Heutzutage kommt die Bürste hauptsächlich im Bereich des Gallengangssystems zum Einsatz. Hier ist eine sichere Probengewinnung im Bereich der zum Teil verletzlichen Gallengänge durchführbar [Govil et al., 2002]. Die Bürstenzytologie zeigt sich der direkten Zellgewinnung durch Aufnahme von Gallenflüssigkeit überlegen [Kurzawinski et al., 1992]. Ihre Sensitivität ist jedoch eingeschränkt und schwankt bei der Erkennung von Cholangiokarzinomen zwischen 44 und 80 % bei der Diagnose von Pankreaskarzinomen zwischen 15 und 65 % [De Bellis et al., 2002]. Sie wird als adjuvante Methode zur Biopsie empfohlen, da abhängig von der Lokalisation der Läsionen Biopsien nur in 40 bis 50% der Fälle kanzeröses Gewebe enthalten [Bardales et al., 1998]. Empfehlungen zu einer Kombination von Bürstenzytologie und Biopsie wurden auch für kolorektale Karzinome publiziert, da das Risiko einer Fehldiagnose durch falsch negative Biopsie reduziert wird [Geramizadeh et al., 2003]. In der Gynäkologie wurden mit Einführung der Bürstenbiopsie Verbesserungen bei der Erkennung von Veränderungen des hochprismatischen Epithels der Endozervix und des endozervikalen Adenokarzinoms festgestellt, da die Bürste in höher gelegene Abschnitte des endozervikalen Kanals eingebracht werden konnte [Boon et al., 1986]. Die Anzahl gewonnener endozervikaler Zellen und damit die Qualität des Abstriches konnte

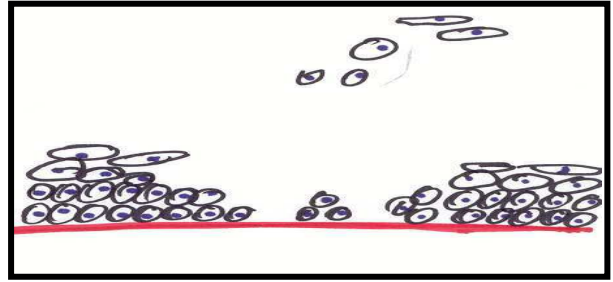
verbessert werden [Murata et al., 1990]. Die Ursache hierfür wurde in der Beschaffenheit der Bürste selbst gesucht, die wesentlich besser die gewonnen Zellen abgibt als Holzspatel oder Wattestäbchen [Trimbos und Arentz, 1986]. Als nachteilig erwies sich, dass die Entnahme mit der Bürste von den Patientinnen oftmals als unangenehm empfunden wurde und das Risiko einer Verunreinigung der Proben durch Blut bestand [Martin-Hirsch et al., 2000].

1.6 Orale Bürstenbiopsie

Nach Etablierung der Zellbürste in der Mitte der Achtzigerjahre des vorigen Jahrhunderts in der Gynäkologie als neuem Entnahmemedium zur Zellgewinnung fanden Überlegungen zur Verwendung des Mediums in der Diagnostik oraler Kanzerosen statt. Dies wurde insbesondere durch die positiven Erfahrungen aus dem gynäkologischen Fachbereich motiviert. Die Bürstenzytologie führte zu einer besseren Übertragbarkeit des Zellmaterials auf den Objektträger [Tiitta et al., 1994], erlaubte eine Entnahme von Zellen aus tieferen Zellschichten, wo in der Mundschleimhaut die squamöse intraepitheliale Neoplasie (SIN) beginnt [Boon et al., 1986; Driemel et al., 2006; Kerl et al., 1991] (Abbildung 12) und verbesserte die Qualität des Abstriches [Murata et al., 1990]. Die höhere Qualität und bessere Handhabbarkeit der Bürstenbiopsie wurde in der Zytodiagnostik oraler Läsionen bestätigt [Jones et al., 1994, Ogden et al., 1992]. Wie die traditionelle Zytologie ermöglicht die Bürstenbiopsie die Erfassung flächiger Areale [Nichols et al., 1991]. Die Sensitivität der nicht methodisch unterstützten Bürstenbiopsie schwankt zwischen 79 und 97%, die Spezifität zwischen 95,1 und 99,5% [Driemel et al., 2007a; Driemel et al., 2007b; Potter et al., 2003; Remmerbach et al., 2001; Remmerbach et al., 2004]. Im Gegensatz zur zytologischen Analyse der Zervix uteri stehen in Deutschland keine speziell qualifizierten zytologischen Assistenten für die Bewertung der oralzytologischen Präparate zur Verfügung, sodass eine methodische Erweiterung der Analyse das Ziel haben muss, einerseits die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen sowie andererseits den Untersuchungsgang zu rationalisieren. Lichtmikroskopisch können lediglich morphologische Charakteristika der Zellatypie erkannt werden. Zusätzliche analytische Verfahren sollen die Sicherheit der konventionellen Bürstenbiopsie erhöhen [Poate et al., 2004].



a



b

Abbildung 12: Schematische Darstellung des grundlegenden Unterschiedes zwischen Exfoliativzytologie und Bürstenbiopsie.

a Exfoliativzytologie der oralen Mukosa. Nur oberflächliche Zellen werden gewonnen.

b Bürstenbiopsie der oralen Mukosa. Zellen aller zur Diagnose relevanten Epithellagen werden geerntet.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Aufgrund der oben beschriebenen Charakteristika des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Vorläuferläsionen ist es sinnvoll, dem Mediziner ein diagnostisches Hilfsmittel zur Verfügung zu stellen, mit dessen Hilfe er eine schnelle Abklärung der Dignität verdächtiger und nicht eindeutig maligner Läsionen erreichen kann. Diese Methode sollte vom Patienten als wenig unangenehm empfunden werden, und für den praktizierenden Arzt einfach zu handhaben sein. Es besteht die Hoffnung, dass der Kliniker durch ein solches Verfahren dazu ermutigt werden kann, auch Läsionen, die sonst unbeachtet blieben, abzuklären und damit eine Verschleppung der Diagnose zu verhindern [Ogden et al., 1997]. Als solches Verfahren bietet sich die zytologische Untersuchung aufgrund ihrer geringen Invasivität und einfachen Durchführung an. Durch Einführung der Zellbürste als ist ein Entnahmemedium geschaffen worden, dass den gewünschten Kriterien entspricht.

Diese Studie soll den diagnostischen Wert der konventionellen Bürstenbiopsie bei der Identifikation oraler Plattenepithelkarzinome unter Berücksichtigung zytomorphologischer Aspekte untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1 Patienten

Innerhalb eines Zeitraumes von 2,5 Jahren wurden an 169 Patienten mit benignen und malignen Mundschleimhautveränderungen Bürstenbiopsien durchgeführt. Von den Patienten waren 79 weiblichen und 90 männlichen Geschlechts. Der Altersdurchschnitt der Patienten betrug 54 Jahre (Minimum bei 19, Maximum bei 84 Jahren). Die Untersuchungen fanden von August 2003 bis Oktober 2004 in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Plastische Operationen der HELIOS Kliniken Erfurt und von November 2004 bis Februar 2006 in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg statt. Es handelte sich um 15 normale Schleimhautbefunde, 31 entzündliche und 61 hyperproliferative Läsionen, außerdem 54 Neoplasien und 8 Rezidive eines Plattenepithelkarzinoms. Als Referenz diente eine daran anschließende Skalpellbiopsie, die einer histopathologischen Begutachtung zugeführt wurde.

2.2 Materialgewinnung

2.2.1 Zytologie

Die vom Doktoranden durchgeführten Untersuchungen fanden in der Ambulanz der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg statt. Zur Durchführung der Bürstenbiopsie wurde das Model Cytobrush[®] Plus GT unsteril der Firma Medscand Medical AB, Schweden, verwendet. Zur Zellgewinnung wurde die Bürste rotierend unter Druck über die Läsionen geführt. Das Auftreten kleiner punktförmiger Blutungen signalisierte dabei eine ausreichende Eindringtiefe der Zellbürste. Die so gewonnenen Zellen wurden anschließend durch Rollen der Bürste um 360 Grad auf einen Objektträger des Typs SuperFrost[®] Plus der Firma Menzel, Deutschland, aufgebracht. Das Abrollen der Bürste erfolgte mehrfach unter Bildung eines wiederkehrenden Musters auf dem Objektträger (Abbildung 13). Nach Lufttrocknung der Objektträger über Nacht schloss sich die Färbung der Präparate nach 10 minütiger Acetonfixierung an. Danach wurden die Objektträger in ein entsprechendes Transportmedium verbracht und zur weiteren Analyse in das pathologische Institut versandt.

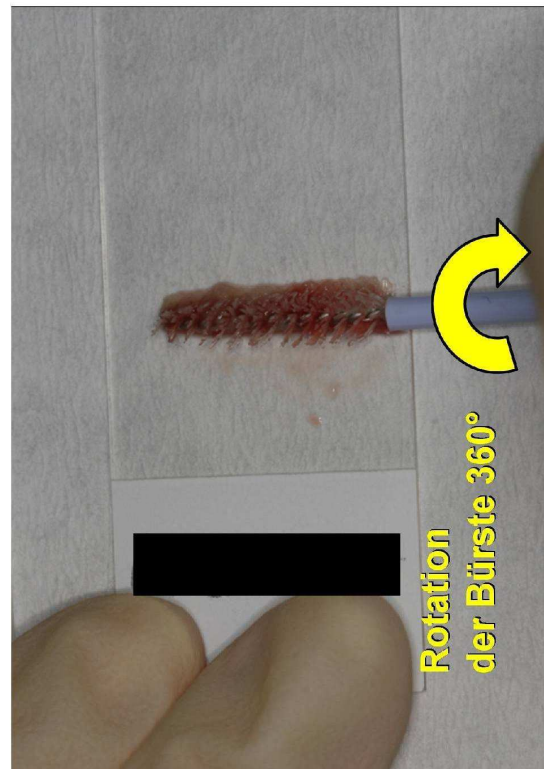
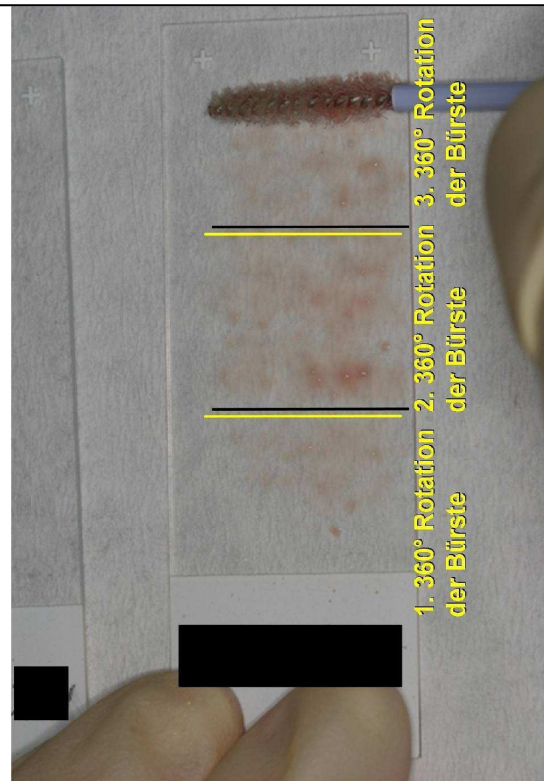
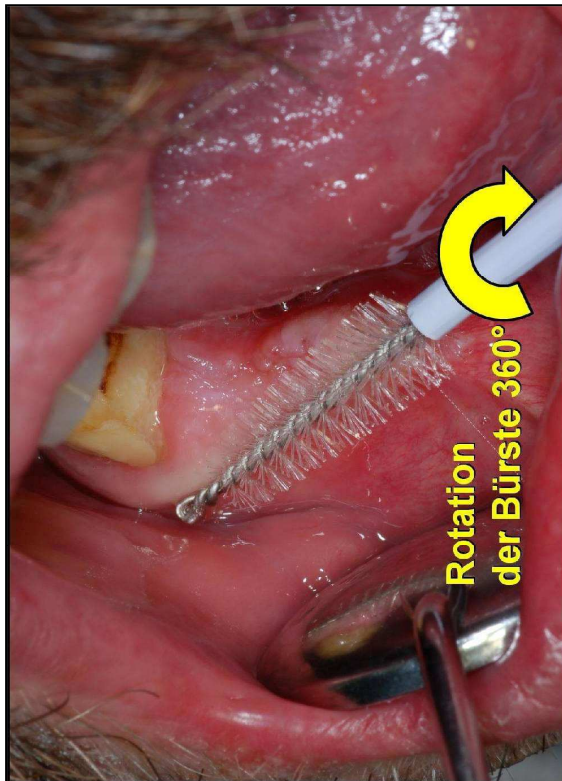


Abbildung 13: Durchführung der Bürstenbiopsie.

2.2.2 Histologie

Nach Gewinnung der Zellen durch die Bürstenbiopsie erfolgte die Exzision einer Gewebeprobe mittels Skalpell. Das gewonnene Material wurde anschließend in Formalin konserviert und mit einem entsprechenden Transportbehälter in das beteiligte pathologische Institut verbracht. Dort erfolgte die Färbung mittels HE und die Einbettung in Paraffin mit anschließender Herstellung von Dünnschnittpräparaten mit dem Mikrotom. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch einen Histopathologen.

2.3 Auswertungskriterien

2.3.1 Histologie

Die histopathologische Befundung erfolgte entsprechend etablierter morphologischer Kriterien der WHO-Klassifikation [Gale et al., 2005] mit Graduierung der Dysplasie in milde Dysplasie, moderate Dysplasie, schwere Dysplasie und Carcinoma in situ durch einen erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. Kosmehl, Erfurt; PD Dr. Schwarz, Erlangen). Um den Vergleich mit anderen Studien zu erleichtern, wurden die Befundkategorien in Tabelle 7 auch anhand der Klassifikation der squamösen intraepithelialen Neoplasie (SIN) und der Ljubljana-Klassifikation der squamösen intraepithelialen Läsionen definiert.

Histologische Befundgruppen	Histologische Befundungskriterien
Gruppe 1: histologisch „tumornegativ“	Normale Mukosa, entzündliche Läsionen, Squamöse Hyperplasie, leichte Dysplasie (SIN I, basale und parabasale Hyperplasie)
Gruppe 2: histologisch „tumorpositiv“	Mittelgradige (SIN II, atypische Hyperplasie) und schwere Dysplasie (SIN III, atypische Hyperplasie), Carcinoma in situ (SIN III), invasives Karzinom, Rezidiv eines Karzinoms

Tabelle 7: Befundungskriterien der Histologie nach der WHO-Klassifikation 2005, der Klassifikation der squamösen intraepithelialen Neoplasie (SIN) und der Ljubljana-Klassifikation der squamösen intraepithelialen Läsionen

2.3.2 Zytologie

Die Auswertung der zytologischen Präparate wurde durch einen Facharzt für Pathologie mit besonderer Erfahrung in der zytopathologischen Diagnostik vorgenommen. Für die Auswertung wurden definierte Kriterien der Malignität herangezogen (Tabelle 8) [Gale et al., 2005; Driemel et al., 2006]. Die Einordnung der Befunde in die zytologische Diagnose erfolgte unter Aspekten der klinischen Anwendung der Bürstenbiopsie in zwei Befundgruppen. Als zytologisch „tumorpositiv“ wurde der Nachweis atypischer Zellen oder jeder nicht sicher als unverdächtig klassifizierbare Befund gewertet, da beide Befundkategorien in einem klinisch-diagnostischen Algorithmus eine sofortige histopathologische Abklärung zur Konsequenz hätten. Das eindeutige Fehlen atypischer Zellen in den Biopaten wurde als zytologisch „tumornegativer“ Befunde klassifiziert (Tabelle 9).

Merkmale der zytologischen Atypie
Abnorme Variation der Kerngröße
Abnorme Variation der Kernform
Abnorme Variation der Zellgröße
Abnorme Variation der Zellform
Pathologische Kernplasmarelation, Hyperchromasie der Kerne
Atypische Mitosefiguren

Tabelle 8: Zytologische Kriterien zur Diagnose von epithelialen Vorläuferläsionen.
Modifiziert nach Gale et al. [Gale et al., 2005]

Zytologischer Befund	Zytologische Befundungskriterien
Gruppe 1: zytologisch „tumornegativ“	Keine atypischen Zellen
Gruppe 2: zytologisch „unsicher“ und zytologisch „tumorpositiv“	Keine eindeutig atypischen Zellen und unklare zytologische Befunde Eindeutiger Nachweis von atypischen Zellen

Tabelle 9: Befundungskriterien der Zytologie

2.4 Statistik

Histopathologischer und Zytopathologischer Befund wurden zueinander in Verhältnis gesetzt. Falsch negative und falsch positive Befunde der Zytologie wurden ermittelt. Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver und negativ Wert wurden nach dem folgenden Schema errechnet:

Die Diagnose lautet:		Ergebnis der Referenz:		
		krank (positiv)	gesund (negativ)	
Ergebnis des Tests:	krank (positiv)	richtige Entscheidung (richtig positiv) A	falsch positiv B	positiver Vorhersagewert = $\frac{A}{A+B}$
	gesund (negativ)	falsch negativ C	richtige Entscheidung (richtig negativ) D	negativer Vorhersagewert = $\frac{D}{D+C}$
		Sensitivität = $\frac{A}{A+C}$	Spezifität = $\frac{D}{D+B}$	

Tabelle 10: Berechnung der statistischen Testparameter nach Harms

Bei Studien, die keine Angaben zu Sensitivität, Spezifität, positiven prädiktiven Wert und negativen prädiktiven Wert enthielten, wurden diese, wenn es aufgrund der geschilderten Ergebnisse möglich war, nach dem obenstehenden Schema berechnet.

2.5 Literaturrecherche

Das Auffinden der Literatur erfolgte mittels einer systematischen Recherche der in der Datenbank Medline gelisteten Titel. Als Suchbegriffe dienten „oral brush biopsy“, „oral exfoliative cytology“ und „oral smear“. Die gefundenen Treffer wurden im Anschluss daran auf ihre inhaltliche Relevanz gesichtet. In der Studie wurden alle bis zum 15.01.2010 eingegangenen Quellen berücksichtigt. Weiteres Quellenmaterial erschloss sich durch Verweise in der so gefundenen Literatur, und wurde ergänzend hinzugezogen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Histologie

Die histologischen Befunde ergaben 107 tumornegative Befunde, wovon 15 Fälle als gesund und 31 als entzündlich verändert bewertet wurden. 61 Präparate zeigten das Bild einer squamösen Hyperplasie.

Ein Carcinoma in situ wurde in zwei Fällen diagnostiziert, 23 Fälle wurden als Tumorstadium T1, 14 als T2, 5 als T3 und 17 als T4 klassifiziert. Insgesamt wurden 169 maligne Befunde erhoben. (Tabelle 11)

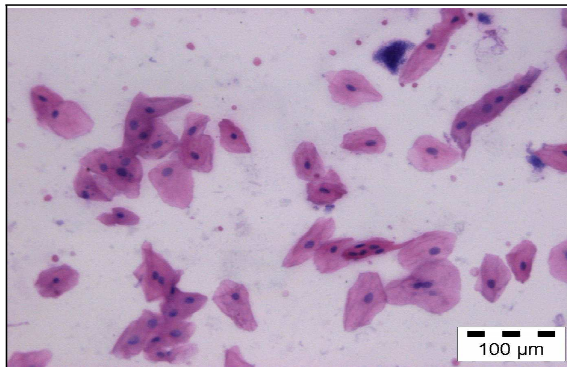
Art der Mundschleimhautläsion	Anzahl
„tumornegative“ Befunde	
Normale Mundschleimhaut, Nichtraucher	15
<i>Entzündliche Läsionen</i>	31
Squamöse Hyperplasien (SIN I, basale und parabasale Hyperplasie)	61
„tumorpositive“ Befunde	
Plattenepithelkarzinom	54
Carcinoma in situ Tis	2
Plattenepithelkarzinom T1 (mic)	3 (3 x G2)
Plattenepithelkarzinom T1	19 (19 x G2)
Plattenepithelkarzinom T2	12 (9 x G2, 3 x G3)
Plattenepithelkarzinom T3	5 (3 x G2, 2 x G3)
Plattenepithelkarzinom T4	13 (9 x G2, 4 x G3)
Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms	8
Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms T1	1 (G2)
Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms T2	2 (2x G2)
Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms T3	1 (G2)
Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms T4	4 (3 x G2, 1 x G3)
Gesamt	169

Tabelle 11: Klassifizierung und Anzahl der Mundschleimhautläsionen.

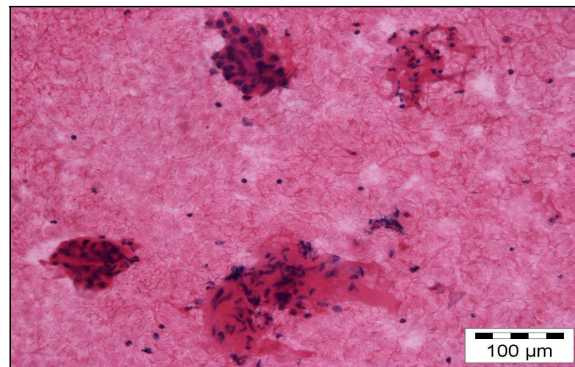
T = Tumorgroße, G = histologisches Grading, (mic) = frühinvasiv

3.2. Zytologie

Auf allen Objektträgern fand sich qualitativ und quantitativ ausreichendes Zellmaterial. Das Zellbild bei unveränderter Mukosa bestand aus großen Epithelzellen mit kleinen uniformen Zellkernen. Die Tumorzellen eines oralen Plattenepithelkarzinoms stellten sich deutlich kleiner dar und fanden sich in Gruppen zusammengelagert. Die Kern-Plasma-Relation war deutlich zugunsten des Nukleus verschoben. Die Zellkerne färbten sich intensiv dunkelblau. (Abbildung 14)



a



b

Abbildung 14: Standardisierte HE-Färbung:

a normale orale Mukosa; große uniforme Epithelzellen mit kleinen gleichförmigen Zellkernen,

b orales Plattenepithelkarzinom; hochgradig pathologische Kern-Plasma-Relation, Anisomorphie und Hyperchromasie der Zellkerne, Zelltrümmer und Bakterien im Hintergrund

In sechs Fällen konnte keine eindeutige Diagnose mittels der bürstenbiptisch gefundenen Zellen in der HE-Übersichtsfärbung gestellt werden. In vier Fällen wurden atypische Zellen aus entzündlichen Mundschleimhautbezirken oder von benignen proliferativen Mundschleimhautläsionen falsch-positiv bewertet. Bei 13 Proben wurde ein falsch-negativer Befund gestellt. Von 54 histologisch gesicherten Karzinomen wurden 10 und von acht Rezidiven wurden drei zytologisch nicht erkannt. (Abbildung 15)

Damit ergibt sich eine Sensitivität für die konventionelle Bürstenzytologie von 79 % und eine Spezifität von 93%. Positiver und negativer Vorhersagewert betrugen 88%. (Tabelle 12)

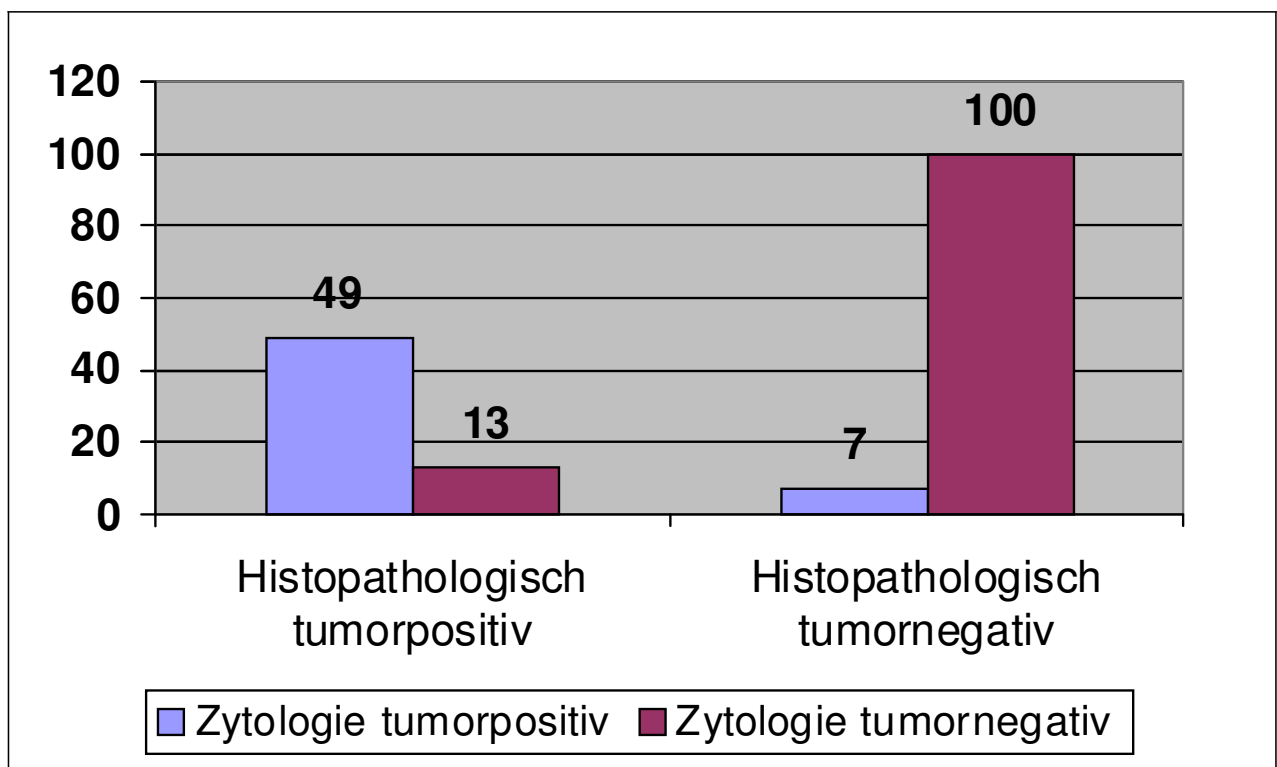


Abbildung 15: Ergebnisse der oralen Bürstenbiopsie nach HE-Färbung in Abhängigkeit von der histopathologischen Referenz.

	Histologie positiv	Histologie negativ	
Zytologie positiv oder nicht eindeutig	Zytologie richtig positiv 49	Zytologie falsch positiv 7	Positiver Vorhersage- wert 88 %
Zytologie negativ	Zytologie falsch negativ 13	Zytologie richtig negativ 100	Negativer Vorhersage- wert 88 %
	Sensitivität 79 %	Spezifität 93 %	

Tabelle 12: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert der Bürstenbiopsie nach HE-Färbung.

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methode

Grundsätzliche Anforderungen an einen Test zur Verbesserung der Früherkennung oraler Plattenepithelkarzinome müssen die Zumutbarkeit für den Patienten, sowie eine möglichst maximale Sensitivität und Spezifität sein, die sicherstellen, dass Kranke als krank und Gesunde als gesund erkannt werden [Zenk et al., 1999].

Die Methode sollte ohne hohen Zeit- und Kostenaufwand anwendbar sein [Doherty, 1989].

Vorteil der Bürstenbiopsie gegenüber der Skalpellbiopsie ist die deutlich reduzierte Invasivität und Schmerzfreiheit des Verfahrens, die dem Patienten etwaige Ängste vor einer Anästhesie, bzw. einer ausgedehnten Wundfläche nimmt [Drinnan, 2000; Zunt, 2001; Hullmann, 2007].

Während die Methode einerseits die Compliance des Patienten fördert, reduziert sie andererseits wie gefordert den Kosten- und Zeitaufwand für den Diagnostiker [Böcking et al., 2004].

Die Studie konnte bestätigen, dass zur Verbesserung der Adhäsion der gewonnenen Zellen, angeraute Objektträger zur Anwendung kommen sollten [King, 1963].

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Zytofärbung mit Hämatoxyllin und Eosin (HE) hat sich neben der Färbung nach Papanicolaou und Mayers Hämalaun im Rahmen der Exfoliativzytologie etabliert [Cawson, 1960; Schneider, 1952].

Da die Bürste aufgrund der räumlichen Struktur und der großen Fläche der Mundhöhle nicht die gesamte Mundschleimhaut erfassen kann, muss sich die orale Bürstenbiopsie auf die Abklärung sichtbarer oraler Läsionen beschränken. Sie muss als Diagnostikverfahren im Rahmen des Monitorings von Patienten mit großflächigen

Läsionen wie oralen Leukoplakien und Erythroplakien verstanden werden, und eignet sich nicht als Screeningverfahren von Mundschleimhautgesunden [Driemel et al., 2008].

Trotz der guten Zugänglichkeit der Mundhöhle für die klinische und instrumentelle Untersuchung [Chiodo et al., 1986; Schleier et al., 2002], fühlt sich ein hoher Prozentsatz der Zahnärzte für eine onkologische Vorsorge nicht ausreichend qualifiziert [Clovis et al., 2002b]. Weltweit ist der Wissensstand der Zahnärzte zum Mundhöhlenkarzinom und seinen Vorläuferläsionen, trotz der fatalen Folgen für den Patienten, die aus einer Diagnoseverschleppung resultieren [Teppo et al., 2003], nicht zufriedenstellend [Horowitz et al., 2000a, 2000b; Clovis et al., 2002a; Nicotera et al., 2004]. Die Bürstenzytologie bietet dem Zahnarzt und Allgemeinarzt eine einfache Methode des Screenings und Monitorings bösartiger epithelialer Mundhöhlentumoren und seiner Vorstufen [Driemel et al., 2005, 2008], die die Aufmerksamkeit der Zahnärzte und Allgemeinärzte auf die orale Mucosa lenkt [Tischendorf, 2005] und zugleich zu einer intensiveren und genaueren Untersuchung der Mundhöhle veranlasst.

Da die Bürstenzytologie seit dem BEMA 2004 mit der Ziffer 05 für den Zahnarzt und der Ziffer 4952 für den Pathologen eine kassenärztlich abrechenbare Leistung präsentiert [Böcking et al., 2004; Breitung und Remmerbach, 2006], rückt sie die Entität Mundhöhlenkarzinom auch vom wissenschaftlichen Standpunkt mehr in den Blickpunkt des Interesses der niedergelassenen und daher wirtschaftlich orientierten Zahnärzteschaft. Durch Fortbildungsveranstaltungen zum Thema „Bürstenzytologie“ wird der Blick der Zahnärzte und Allgemeinärzte für orale Schleimhautläsionen geschult, wird die fachliche Kompetenz gesteigert und werden Veränderungen der Mundschleimhaut bewusster wahrgenommen. Die Bürstenzytologie dokumentiert, dass die Zahnmedizin eine ärztliche und keine technische Disziplin darstellt

[Tischendorf, 2005] und kann das dem Menschen dienende, verantwortungsbewusste Handeln der Zahnärzte fördern.

Für orale Plattenepithelkarzinome gelten Rauchen, Alkoholgenuss und schlechte Mundhygiene als ätiologische Faktoren mit synergistischem Effekt [Blot et al., 1988; Bier, 1991; Zain, 2001; Adam, 2003]. In Europa geben 75% aller Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen regelmäßigen Nikotin- und Alkoholgenuss an [La Vecchia et al., 1997]. Da diese Patienten in der Regel wenig auf ihren Gesundheitszustand achten, ziehen sie erst im fortgeschrittenen Tumorstadium einen Arzt zu Rate. Trotz intensiver Aufklärung und Beratung waren in einer Studie von Sankaranarayanan und Mitarbeitern 40-50% von Patienten mit suspekten oralen Läsionen keiner weiteren diagnostischen Abklärung zugänglich [Sankaranarayanan et al., 2000, 2002].

Die Compliance des Patienten bleibt daher auch in Zukunft entscheidender und mitunter begrenzender Faktor in der Früherkennung oraler Plattenepithelkarzinome trotz einer möglichen Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Gegenüber der histologischen Untersuchung als Referenzmethode erreichte die konventionelle, zytologisch-morphologische Auswertung HE-gefärbter Bürstenbiopate in der eigenen Studie eine Sensitivität von 79% bei einer Spezifität von 93%. Diese Ergebnisse liegen innerhalb des in der Literatur abgebildeten Spektrums für die Treffsicherheit der Bürstenzytologie bei oralen Läsionen (Tabelle 13), erreichen allerdings nicht die hohe Zuverlässigkeit der Methode für die Untersuchung der Transformationszone der Portio uteri. Auffällig ist auch der erhebliche Unterschied zu der deutlich geringeren Erkennungsrate der Bürstenbiopsie bei Läsionen des Nasopharynx. So berichten Chen und Mitarbeiter über eine Sensitivität um 66%, allerdings bei einer hohen Spezifität (100%) [Chen et al., 2002].

In der Zusammenschau zeigen diese Daten zwar tendenziell eine Verbesserung gegenüber der klassischen Exfoliativzytologie, jedoch deutet die weiterhin breite Spanne von Sensitivität (66-100%) und Spezifität (32-100%) auf einen relevanten Einfluss von Rahmenparametern wie Entnahmeregion und -technik, Selektion der Patientenkohorten, Referenzmethode, Definition von Schrankenwerten der Befundkategorien oder subjektiven Ermessensspielräumen der zytologischen Befundung hin.

Für die Zuordnung der Befunde als „tumorpositiv“ beziehungsweise „tumornegativ“ orientierte sich die vorliegende Studie an den notwendigen Konsequenzen in einem klinisch diagnostischen Entscheidungsalgorithmus: Bei Vorliegen atypischer Zellen oder bei Befunden, in denen das Vorliegen atypischer Zellen nicht sicher ausgeschlossen werden kann, sollte im eigenen diagnostischen Konzept grundsätzlich von einem möglichen pathologischen Befund ausgegangen werden, demzufolge dann die Exzision und histopathologische Begutachtung folgen muss.

Da die konventionelle Bürstenbiopsie nach Ansicht der eigenen Arbeitsgruppe in der Praxis vor allem als Instrument zur diagnostischen Absicherung bei der Abklärung primär nicht tumorverdächtiger Läsionen der Mundschleimhaut verwendet werden sollte, ist diese Definition eines Schrankenwertes zugunsten einer hohen Sensitivität sinnvoll. Nachdem bei diesen Läsionen die Indikation zur Skalpellbiopsie ansonsten eher zurückhaltend gestellt würde, stellt die Bürstenbiopsie in dieser Indikation eine einfache und praktikable Ergänzung einer Beobachtungsstrategie dar.

Die 13 falsch-negativen zytologischen Befunde der eigenen Kohorte zeigen allerdings, dass das bereits aus der klassischen Exfoliativzytologie bekannte Problem der vergleichsweise geringen Sensitivität auch durch die Einführung der Bürsten-Entnahmetechnik noch nicht ausreichend gelöst ist [Becker, 1966]. Um einen Fortschritt insbesondere in der Frühdiagnostik von oralen Vorläuferläsionen, unter Erhalt der genannten Vorteile der Bürstenbiopsie, zu erzielen, muss sich daher die Forderung ableiten, mit Hilfe kostengünstiger und allseits zur Verfügung stehender Verfahren die Sensitivität und Spezifität der oralen Bürstenzytologie zu erhöhen.

Als ergänzende Technik bei der Auswertung oraler Abstrich- oder Bürstenbiopate wurden bereits in der Vergangenheit verschiedene immunzytologische Analysen, beispielsweise von Zytokeratinen [Ogden et al., 1994; Ogden et al., 1996] oder p53 [Ogden et al., 1994; Scheifele et al., 2002] und in den letzten Jahren die DNA-Image-Zytometrie [Böcking et al., 2004; Maraki et al., 2004, 2006; Remmerbach et al., 2004; Pektas et al., 2006] angewendet. Erste Ergebnisse mit neueren immunzytologischen Markern wie Mcm-2/Mcm-5 [Scott et al., 2006] und γ 2-Kette von Laminin-5 [Driemel et al., 2007] lassen eine weitere Verbesserung der Treffsicherheit mittels standardisierter und in histopathologischen Laboratorien weit verbreiteter, preisgünstiger Methoden erwarten. Für alle neuen Methoden ist jedoch kritisch anzumerken, dass bislang keine ausreichenden Daten für die Erkennung und Differenzierung von „High-risk“-

Vorläuferläsionen [Küffer und Lombardi, 2002] und von frühinvasiven bzw. kleinen Karzinomen vorliegen.

Im folgenden Abschnitt erfolgt eine genauere Betrachtung der bislang zur Verfügung stehenden ergänzenden analytischen Verfahren.

4.3 Diskussion ergänzender Verfahren zur konventionellen Bürstenbiopsie

4.3.1 DNA-Image-zytometrisch unterstützte Bürstenbiopsie

Die DNA-Image-Zytometrie bestimmt als zusätzliches Malignitätskriterium den DNA-Ploidie-Gehalt. DNA-Ploidie beschreibt hierbei etwaige numerische Chromosomenaberrationen, wie sie als Folge von Genommutationen durch Fehlverteilung ganzer Chromosomensätze oder einzelner Chromosomen verursacht werden können [Driemel, 2003; Sen, 2000]. Die auf einen Objektträger aufgebrachten Einzelzellen werden mit dem DNA-spezifischen Feulgen-Farbstoff markiert und die Kern-DNA mithilfe spezieller Softwareprogramme unter dem Mikroskop mit einer Digitalkamera quantifiziert. Typischerweise werden 300 suspekte Zellen mit nicht pathologischen, als Referenz dienenden Zellen verglichen, um DNA-Gehaltsabweichungen vom normalen diploiden Wert zu bestimmen. Da dieses Verfahren sich vor allem für zellarme Proben eignet, wird es für die Untersuchung von Bürstenbiopsaten empfohlen [Böcking et al., 2004]. Nicht detektierbar bleiben Mundhöhlenkarzinome mit diploidem DNA-Gehalt [Burkhardt und Maerker, 1978]. Durch eine Kombination von konventioneller Bürstenbiopsie und DNA-Image-Zytometrie sollen sich sowohl Sensitivität als auch Spezifität der Identifikation oraler Karzinome auf 100% steigern lassen [Maraki et al., 2004; Remmerbach et al., 2004] (Tabelle 13).

Die Anzahl der insuffizienten zytologischen Präparate wird mit 0,5% angegeben [Breitung und Remmerbach, 2006]. Die Interpretation der DNA-Zytometrie-Ergebnisse im Hinblick auf eine frühe Detektion oraler Plattenepithelkarzinome bei fehlendem morphologischem Korrelat wird kritisch diskutiert [Burkhardt, 2006; Maraki et al., 2006].

4.3.2 Computerunterstützte Bildanalyse des Bürstenbiopates (OralCDx®)

OralCDx® wurde als computergestütztes Verfahren zur Analyse bürstenbiopatischen Materials von der Firma CDx Laboratories (Suffern, NY, USA) entwickelt. Ein Rechner analysiert das digitalisierte Mikroskopbild der geernteten Zellen auf ihren Keratinisierungsgrad und auf morphologische Veränderungen. Analyseergebnis und ausgewählte Zellen werden einem Pathologen am Bildschirm präsentiert. Dieser befundet einzelne Zellen gezielt nach und empfiehlt dem Behandler anschließend das weitere Vorgehen (klinische Kontrolle, erneute Bürstenbiopsie, Skalpellbiopsie) [Burkhardt et al., 2006]. Die automatisierte Bildanalyse erreicht Sensitivitäten zwischen 71,4 und 100% [Poate et al., 2004; Scheifele et al., 2004; Sciubba, 1999; Svirsky et al., 2002]. Unerkannt bleiben 3,5% der histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinome [Potter et al., 2003] (Tabelle 4). Die Quote der quantitativ oder qualitativ unzureichenden Präparate wird je nach Autor mit 2–7% angegeben [Poate et al., 2004; Scheifele et al., 2004]. Die computerunterstützte Bildanalyse (OralCDx®) ist lizenzgebunden und steht in Deutschland nur begrenzt zur Verfügung.

4.3.3 Immunzytochemisch erweiterte Bürstenbiopsie

Die Immunzytochemie hebt im Präparat maligne transformierte Zellen durch Markierung tumorspezifischer Antigenstrukturen hervor und vereinfacht die Diagnostik. Sie stellt eine in pathologischen Instituten weit verbreitete und etablierte Methode dar. Eine immunzytochemische Färbung der Bürstenbiopate wurde erstmals Mitte der Neunzigerjahre vorgeschlagen. Ogden et al. ermittelten eine eingeschränkte Sensitivität der Zytokeratinidentifizierung mit Antikörpern gegen Zytokeratin 8 und 19 [Ogden et al., 1994]. Aktuelle Studien beschreiben die immunzytochemische Detektion atypischer Zellen mit den extrazellulären Matrixproteinen γ 2-Kette von Laminin 5 [Driemel et al., 2007a] und hochmolekulares Tenascin C [Driemel et al., 2007b], die im oralen Plattenepithelkarzinom als Schlüsselproteine der Invasions- und Metastasierungskaskade hochgradig überexprimiert werden [Franz et al., 2006]. Sowohl die mit der γ 2-Kette von Laminin 5 als auch die mit hochmolekularem Tenascin C unterstützte konventionelle Zytologie scheinen mit einer Sensitivität von 93 bzw. 95% geeignet, atypische bzw. invasionsfähige Zellen im oralen Bürstenbiopate zu identifizieren. Spezifität sowie positiver und negativer Vorhersagewert der mit hochmolekularem Tenascin C erweiterten Bürstenbiopsie liegen nur knapp unter den Werten für die γ 2-Kette von Laminin 5 [Driemel et al., 2007a, b] (Tabelle 13). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte mittels Protein-Chip arrays (SELDI) zwei für proliferatives Gewebe spezifische Proteine (S100A8 und S100A9) identifizieren, die sich zukünftig als wertvoll beim Monitoring oraler Läsion erweisen könnten [Driemel et al., 2007c].

Scott et al. [Scott et al., 2006] verfolgten einen anderen immunzytochemischen Ansatz. Sie färbten exfoliativ-zytologische Abstriche mit Antikörpern gegen MCM („mini chromosome maintenance“) – Proteine, die eine entscheidende Rolle in der

DNA-Replikation spielen. Aussagen zur Sensitivität und Spezifität wurden nicht getroffen.

4.3.4 Dünnschichtzytologie („liquid-based cytology“)

Die primär in der Gynäkologie erprobte Dünnschichtzytologie modifiziert die zelluläre Aufbereitung und soll die zytologische und immunzytochemische Analyse der Bürstenbiopate optimieren [Hayama et al., 2005; Kujan et al., 2006]. Durch Anfertigung einer Zellsuspension aus dem gewonnenen zytologischen Material gelingt es, dieses dünn-schichtig auf das Trägermaterial aufzubringen, und Verklumpungen, Zellverlust und eine ungleichmäßige Verteilung der Zellen zu vermeiden [Bishop et al., 1998; Howell et al., 1998; McGoogan and Reith, 1996; Vassilakos et al., 1996]. Die Methode benötigt jedoch einen erhöhten apparativen Aufwand [Hayama et al., 2005] und hebt einen Vorteil der Bürstenbiopsie auf. Insbesondere mit dem OralCDx[®]-System lassen sich kleine Plattenepithelverbände gewinnen, die eine Bewertung nach histologischen Kriterien gestatten [Burkhardt et al., 2006]. Die gezielte Vereinzelung der Zellen in der Dünnschichtzytologie zerstört die Plattenepithelverbände, sodass eine Beurteilung der Epithelschichtung unmöglich wird. Neben der Erprobung der Methode an normaler Mundschleimhaut [Kujan et al., 2006] wurde bislang in einer Studie eine Sensitivität von 95,1 % und eine Spezifität von 99,0 % ermittelt. 8,8% der Proben waren nicht verwertbar [Navone et al., 2007].

4.3.5 Molekulare Analyse

Scheifele et al. analysierten an oralen Bürstenbiopsaten Punktmutationen im Apoptose-Gen *p53* [Scheifele et al., 2002]. Dieses Tumorsuppressorgen reguliert Zellzyklus und Apoptose von Zellen mit defekter DNA-Sequenz. Der Nachweis von *p53*-Mutationen stellt hinsichtlich der malignen Transformation von Leukoplakien einen prognostischen Faktor dar, der in der Bürstenbiopsie einfach bestimmt werden kann [Aguirre et al., 2004; Scheifele et al., 2002]. Die Aussagekraft des Parameters bedarf allerdings noch der Bewertung in der klinischen Praxis [Ralhan et al., 2001; Ranasinghe et al., 1993; Rich et al., 1999; Sen, 2000; Warnakulasuriya, 2000]. Über die Bestimmung der „nuclear organizer regions“ (NOR) der RNA sehen Remmerbach et al. eine Möglichkeit zur Bestimmung von malignen Zellen in Bürstenbiopsaten [Remmerbach et al., 2003]. Die NOR sind ein Parameter für die Syntheseleistung einer Zelle und damit ihrer Proliferation und können auch entzündlich hyperplastische Mundschleimhautveränderungen verstärkt anfärben [Paula, 2000]. Aufgrund des technischen Aufwands gilt die AgNOR-Analyse trotz der vielversprechenden Resultate mit beschriebenen Sensitivitäten und Spezifitäten von 100 % [Remmerbach et al., 2003; 2009] nicht als Routineverfahren.

Eine einzelne Fallbeschreibung schilderte den Einsatz des melanoma-associated antigens A (MAGE A) zur Analyse oraler Bürstenbiopsie. Im beschriebenen Fall gelang aufgrund signifikant erhöhter Expression von MAGE-A3 und A4, eine Leukoplakie der Mundschleimhaut als suspekt zu klassifizieren. Eine zuvor durchgeführte Skalpellbiopsie hatte keine Dysplasien gezeigt. Der zytologische Befund veranlasste die Untersucher, eine vollständige Exzision durchzuführen, die zur abschließenden histopathologischen Diagnose eines Cis führte. Die Arbeitsgruppe

kündigte weitere Untersuchungen zur Prüfung der Wertigkeit des Analyseverfahrens an [Metzler et al., 2009].

Autor (Publikations- datum)	Methode	Fall- zahl	Sensitivität in %	Spezifität in %	positiver prädiktiver Wert	negativer prädiktiver Wert
Sciubba (1999)	Computer gestützte Bildanalyse (OralCDx®)	945	100	93	90	100
Remmerbach et al. (2001)	konventionell DNA-Image- Zytometrie kombiniert	251	94,6	99,5	98,1	98,5
		251	96,4	100	100	99
		251	98,2	100	100	99,5
Svirsky et al. (2002)	Computer gestützte Bildanalyse (OralCDx®)	-	95,9	-	38	-
Potter et al. (2003)	keine Angabe	115	97	-	-	-
Rick and Slater (2003)	Computer gestützte Bildanalyse (OralCDx®)	-	90,9	-	-	-
Maraki et al. (2004)	konventionell und	98	100	97,4	89	100

	DNA-Image-Zytometrie					
Poate et al. (2004)	Computer gestützte Bild- analyse (OralCDx®)	49	71,4	32	44,1	60
Remmerbach et al. (2003)	konventionell kombiniert mit AgNOR - Analyse	75	92,5	100	100	85
Remmerbach et al. (2004)	konventionell	322	91,3	95,1	95,4	92,3
	DNA-Image- Zytometrie	322	95,5	100	100	96,2
	kombiniert	322	97,8	100	100	98,1
Scheifele et al. (2004)	Computer gestützte Bild- analyse (OralCDx®)	96	92,3	94,3	85,7	97,1

Driemel et al. (2007)	konventionell	93	79	100	100	92
	Ln-5	93	93	98	97	97
	Immunzyto- chemie	93	93	100	100	97
	kombiniert (konventionell und γ 2-Kette von Ln-5 Immunzytoche- mie)					
Driemel et al. (2007)	konventionell	159	78	96	92	89
	hm Tn-C	159	83	93	88	90
	Immun- zytochemie	159	95	99	98	97
	kombiniert (konventionell und hm Tn-C Immun- zytochemie)					
Mehrotra et al. (2008)	Konventionell	79	76,8	93,3	-	-

Remmerbach et al. (2009)	Multimodal cell analysis (MMCA):					
	Konventionell	47	100	92,6	90,9	100
	Image- zytometry	47	90	100	100	93,1
	AgNOR	47	100	100	100	100

Tabelle 13: Ergebnisse der Bürstenbiopsie und ihrer methodischen Erweiterungen.

5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Die orale Bürstenbiopsie erreichte bei konventioneller Färbetechnik und morphologischer Auswertung eine Sensitivität um 80%. Damit sollte sie nicht als Endpunktdiagnostik zum Ausschluss einer malignen Läsion eingesetzt werden.
2. Eine sinnvolle Anwendung der Bürstenbiopsie besteht bei Schleimhautveränderungen, die klinisch als benigne gewertet werden. Hier kann die Bürstenbiopsie eine klinische Fehleinschätzung frühzeitig aufdecken. Aufgrund ihrer einfachen, kostengünstigen und nichtinvasiven Wiederholbarkeit bieten sich die Bürstenbiopsie basierten Verfahren auch zur Verlaufskontrolle bekannter, als nicht maligne bewerteter Mundschleimhautareale an.
3. Während die Skalpelliobiopsie den lokalen Befund in einer großflächigen Läsion eindeutig beschreibt, aber eingeschränkt für den Gesamtbefund sein kann, kann die Bürstenbiopsie bei eingeschränkter diagnostischer Sicherheit einen Eindruck von der Gesamtläsion vermitteln. Sie ist daher ideal für das Monitoring großflächiger Läsionen.
4. Die Bürstenbiopsie kann auch für den onkologisch erfahrenen Arzt ein diagnostisches Hilfsmittel bei der Früherkennung oraler Karzinome sein.
5. Andere Screeningverfahren wie Toluidinblau, Photodynamik und Auto-fluoreszenz sind aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität, hohem

Aufwand oder fehlender Datenlage zurzeit nicht zum klinischen Routineeinsatz geeignet.

6. Die histopathologische Begutachtung nach Skalpellbiopsie bleibt der Goldstandard in der definitiven Diagnostik maligner oraler Läsionen. Bei jedem klinisch dringendem Karzinomverdacht erübrigt sich eine Bürstenbiopsie und es wird unmittelbar eine Skalpellbiopsie in der weiterbehandelnden Fachklinik erforderlich.
7. Zur Steigerung von Sensitivität und Spezifität der Bürstenbiopsie sind analytische Erweiterungen des Verfahrens indiziert.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Fragestellung

1951 wurde die Exfoliativzytologie von Montgomery und von Haam in der Diagnostik maligner Mundschleimhautveränderungen eingeführt. Die moderne Bürstenbiopsie soll als modifizierte Entnahmetechnik die geringe Sensitivität und Spezifität der klassischen oralen Exfoliativzytologie erhöhen. Die vorliegende prospektive Studie untersucht die Wertigkeit der oralen Bürstenbiopsie in Verbindung mit konventionellen zytologischen Auswertungsmethoden zur Erkennung oraler Plattenepithelkarzinome und ihrer Vorläuferläsionen.

Patienten und Methoden

Bei 169 konsekutiven Patienten mit klinisch suspekten Mundschleimhautveränderungen wurden Skalpell- und Bürstenbiopsien simultan entnommen. Die Befunde wurden jeweils als „tumornegativ“ (kein Hinweis auf Atypien oder Nachweis von Tumorzellen) oder „tumorpositiv“ (atypische Zellen oder unsichere Befunde) klassifiziert.

Ergebnisse

In 6 Fällen konnte anhand der HE-Übersichtsfärbung nur eine eingeschränkte zytologische Diagnose erstellt werden. Diese wurden als „tumorpositiv“ gewertet, da in einem klinisch-diagnostischen Algorithmus eine sofortige histopathologische Abklärung die Folge wäre. Die konventionelle Zytologie ergab sieben falsch-positive Fälle, d.h. atypische Zellen in entzündlicher oder benigner hyperproliferativer Schleimhaut. Die Spezifität betrug 93 %. In 13 weiteren Fällen wurde eine falsch-negative Diagnose

gestellt: zehn von 54 Karzinomen und drei von acht Rezidiven wurden zytologisch nicht erkannt. Dies führte zu einer eingeschränkten Sensitivität der konventionellen Zytologie von 79 %. Positiver und negativer Vorhersagewert betrugen 88 %.

Schlussfolgerungen

1. Die orale Bürstenbiopsie erreichte bei konventioneller Färbetechnik und morphologischer Auswertung eine Sensitivität um 80%. Damit sollte sie nicht als Endpunktdiagnostik zum Ausschluss einer malignen Läsion eingesetzt werden.
2. Eine sinnvolle Anwendung der Bürstenbiopsie besteht bei Schleimhautveränderungen, die klinisch als benigne gewertet werden. Hier kann die Bürstenbiopsie eine klinische Fehleinschätzung frühzeitig aufdecken.
3. Während die Skalpellbiopsie den lokalen Befund in einer großflächigen Läsion eindeutig beschreibt, aber eingeschränkt für den Gesamtbefund sein kann, kann die Bürstenbiopsie bei eingeschränkter diagnostischer Sicherheit einen Eindruck von der Gesamtläsion vermitteln. Sie ist daher ideal für das Monitoring großflächiger Läsionen.
3. Die Bürstenbiopsie kann auch für den onkologisch erfahrenen Arzt ein diagnostisches Hilfsmittel bei der Früherkennung oraler Karzinome sein.
4. Die histopathologische Begutachtung nach Skalpellbiopsie bleibt der Goldstandard in der definitiven Diagnostik maligner oraler Läsionen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdel-Salam M, Mayall BH, Hansen LS, Chew KL, Greenspan JS (1986) Nuclear DNA Analysis of oral hyperplasia and dysplasia using image cytometry. J Oral Pathol 16: 431-435
2. Adam C (2003) Tumoren im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich unter spezieller Berücksichtigung von Plattenepithelkarzinomen. Datenbankgestützte Dokumentation, Med Dissertation, Universität Tübingen
3. Aguirre JM, Lopez M, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, Castro A, de Pancorbo MM (2004) Use of cytological specimens for p53 Gene alteration detection in oral squamous cell carcinoma risk patients. Clin Oncol 16: 366-370
4. Allison P, Franco E, Black M, Feine J (1998) The role of professional diagnostic delay in the prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma. Oral Oncol 34: 147-153
5. Amir Z, Kwan SY, Landes D, Feber T, Williams SA (1999) Diagnostic delays in head and neck cancers. Eur J Cancer Care 8: 198-203
6. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris (2008) Head and neck cancer. Lancet 371: 1695-1709

7. Banoczy J (1969) Exfoliative cytologic changes in oral leukoplakia. J Dent Res 48: 17-21
8. Bardales RH, Stanley MW, Simpson DD, Baker SJ, Steele CT, Schaefer RF, Powers CN (1998) Diagnostic value of brush cytology in the diagnosis of duodenal, biliary, and ampullary neoplasms. Am J Clin Pathol 109: 540-548
9. Batsakis JG, Suarez P, El-Naggar AK (1999) Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. Oral Oncol 35: 354-359
10. Beale LS (1860) Examination of sputum from case of cancer of the pharynx and adjacent parts. Arch Med 2: 44-46
11. Becker R, Erwig R, Lorscheid G, Schmidseider R (1966) Vergleichende zytologische und histologische Untersuchungen zur Tumordiagnostik. Dtsch Zahnarztl Z 21: 145-148
12. Bertalanffy L (1959) Eine fluoreszenzmikroskopische Schnellmethode zur Diagnose des gynäkologischen Carcinoms. Klin Wochenschr 37: 469-471
13. Bertalanffy L, Bertalanffy FD (1961) Die Fluoreszenzmethode in der Zytodiagnostik des gynäkologischen Karzinoms. Med Welt 35: 1742-1751
14. Bier J (1991) Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich. In: Horch HH (Hrsg) Praxis der Zahnheilkunde Bd 10/II: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie II, Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore, S 267-359

15. Bishop JW, Bigner SH, Colgan TJ, Husain M, Howell LP, McIntosh KM, Taylor DA, Sadeghi MH (1998) Multicenter masked evaluation of AutoCyte PREP thin layers with matched conventional smears – including initial biopsy results. *Acta Cytol* 42: 189-197
16. Blot WJ, Mc Laughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48: 3282-3287
17. Böcking A, Remmerbach T, Becker J (2004) Bürstenbiopsie zur Mundkrebsfrüherkennung. *Zahnärztl Mitteil* 9: 28-32
18. Boon ME, Alons-van Kordelaar JJM, Rietveld-Scheffers PEM (1986) Consequences of the introduction of combined spatula and cytobrush sampling for cervical cytology - Improvements in smear quality and detection rates. *Acta Cytolog* 30: 264-270
19. Brandenburg W, Grulms R (1956) Vergleichende exfoliative Cytologie der Mundschleimhaut bei Mann und Frau. *Ärztl Wochenschr* 11: 195-197
20. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM (2002) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 38: 99-166

21. Breitung K, Remmerbach TW (2006) Mundkrebsfrüherkennung – eine Herausforderung in der Oralen Medizin. Freier Zahnarzt 7-8/2006: 40-45
22. Burkhardt A, Maerker R (1978) Dysplasieklassifikation oraler Leukoplakien und Präkanzerosen. Bedeutung für Prognose und Therapie. Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir 2: 199-205
23. Burkhardt A, Burkhardt AM, Aklan T (2006) Die Bürstenbiopsie - Grundlagen und Ergebnisse einer neuen Methode zur Abklärung von Mundschleimhautläsionen. Thüringer Zahnarztl 04: 21-29
24. Burkhardt A (2006) Letter to the editor: Very early cytological and DNA-cytometric diagnosis of in situ carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. J Oral Pathol Med 35: 520-522
25. Camilleri GE, Smith CJ (1964) Exfoliative Cytology in experimental oral carcinogenesis. Acta Cytolog 8: 85-90
26. Caulder SL (1967) Fluorescence microscopy utilizing acridine orange in oral cytodiagnosis. Oral Surg 23: 343-350
27. Cawson RA (1960) The cytological diagnosis of oral cancer. Brit Dent J 19: 294-298

28. Chiodo GT, Eigner T, Rosenstein DI (1986) Oral cancer detection. The importance of routine screening for prolongation of survival. *Postgrad Med* 80: 231-236
29. Christian DC (2002) Computer-assisted analysis of oral brush biopsies at an oral cancer screening program. *JADA* 133: 357-362
30. Clovis JB, Horowitz Am, Poel DH (2002a) Oral and pharyngeal cancer: knowledge and opinions of dentists in British Columbia and Nova Scotia. *J Can Dent Assoc* 68: 415-420
31. Clovis JB, Horowitz Am, Poel DH (2002b) Oral and pharyngeal cancer: practices and opinions of dentists in British Columbia and Nova Scotia. *J Can Dent Assoc* 68: 421-425
32. Cowpe JG, Ogden GR, Green MW (1993) Comparison of planimetry and image analysis for the discrimination between normal and abnormal cells in cytological smears of suspicious lesions of the oral cavity. *Cytopathology* 4: 27-35
33. De Bellis M, Sherman S, Fogel EL, Cramer H, Chappo J, McHenry L Jr, Watkins JL, Lehman GA (2002) Tissue sampling at ERCP in suspected malignant biliary strictures (Part 1). *Gastrointest Endosc* 56: 552-561
34. Doherty SA (1989) Basic issues in screening for oral cancer among male subpopulation. *J Tenn Dent Assoc* 69: 26-29

35. Driemel (2003) Bestimmung des klonalen DNA-Gehaltes bei Speicheldrüsentumoren mit Hilfe hochauflösender DNA-Durchflusszytometrie, Med Dissertation, Universität Ulm
36. Driemel O, Hertel K, Reichert TE, Kosmehl H (2006) Aktuelle Klassifikation der Präkursorläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms: Prinzipien der WHO-Klassifikation 2005. Mund Kiefer Gesichtschir 10 (2): 89-94
37. Driemel O, Dahse R, Berndt A, Pistner H, Hakim SG, Zardi L, Reichert TE, Kosmehl H (2007) High-molecular tenascin-C as an indicator of atypical cells in oral brush biopsies. Clin Oral Invest 11: 93-9
38. Driemel O, Dahse R, Hakim SG, Tsioutsias T, Pistner H, Reichert TE, Kosmehl H (2007) Expression analysis of extracellular matrix components in brush biopsies of oral lesions. Anticancer Res 27: 1565-70
39. Driemel O, Dahse R, Hakim SG, Tsioutsias T, Pistner H, Reichert TE, Kosmehl H (2007) Laminin-5 immunocytochemistry: a new tool for identifying dysplastic cells in oral brush biopsies. Cytopathology 18: 348-55
40. Driemel O, Murzik U, Escher N, Melle C, Bleul A, Dahse R, Reichert TE, Ernst G, von Eggeling F (2007) Protein profiling of oral brush biopsies: S100A8 and S100A9 can differentiate between normal, premalignant and tumour cells. Proteomics - Clinical Applications 1: 486-93

41. Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, Kleinsasser N, Staudenmaier R, Müller-Richter U, Reichert TE, Kosmehl H (2008) Wertigkeit der konventionellen oralen Bürstenbiopsie. HNO 56: 205-210
42. Drinnan AJ (2000) Screening for oral cancer and precancer - valuable new technique. Gent Dent 48: 656-660
43. Dumbach J, Sitzmann F, Pesch HJ (1981) Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf Malignom der Mundhöhle unter besonderer Berücksichtigung der Exfoliativ-Zytologie. Dtsch Zahnarztl Z 36: 697-700
44. Eggeling von F, Junker K, Fiedler W, Wollscheid V, Durst M, Claussen U, Ernst G (2001) Mass spectrometry meets chip technology: A new proteomic tool in cancer research? Electrophoresis 22: 2898-2902
45. El Naggari AK, Reichart PA (2005) Proliferative verrucous leukoplakia and precancerous conditions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D (eds) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press, Lyon, pp 180-181
46. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D (2001) Head and neck cancer. N Engl J Med 27: 1890-1900

47. Franz M, Hansen T, Richter P, Borsi L, Böhmer FD, Hyckel P, Schleier P, Katenkamp D, Zardi L, Kosmehl H, Berndt A (2006) Complex formation of the laminin-5 gamma2 chain and large unspliced tenascin-C in oral squamous cell carcinoma in vitro and in situ: implications for sequential modulation of extracellular matrix in the invasive tumor front. *Histochem Cell Biol* 126: 125-131
48. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J (2005) Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon, pp 140-143
49. Gardner AF (1965) An investigation of 890 patients with cancer of the oral cavity: its incidence, etiology, prognosis and relationship to oral exfoliative cytology. *Acta Cytol* 9: 273-281
50. Gastpar H (1966) Exfoliativ- und blutzytologische Untersuchungen bei malignen Tumoren im Pharynx- und Larynxbereich. *Fortschr Med* 84: 783-786
51. Geramizadeh B, Hooshmand F, Kumar PV (2003) Brush cytology of colorectal malignancies. *Acta Cytol* 47: 431-434
52. Gladstone SA (1951) Sponge biopsy in the diagnosis of the cancer in the mouth. *J Oral Surg* 9: 104-109

53. Govil H, Reddy V, Kluskens L, Treaba D, Massarani-Wafai R, Selvaggi S, Gattuso P (2002) Brush cytology of the biliary tract: retrospective study of 278 cases with histopathologic correlation. *Diagnostic Cytopathology* 26: 273-277
54. Greenspan D, Jordan RC (2004) The white lesion that kills - aneuploid dysplastic oral leukoplakia. *N Engl J Med* 350: 1382-1384
55. Guggenheimer J, Verbin RS, Johnson JT, Horkowitz CA, Myers EN (1989) Factors delaying the diagnosis of oral and oropharyngeal carcinomas. *Cancer* 64: 932-935
56. Hanks CT, Chaudhry AP, Neiders ME (1969) Reliability of exfoliative cytology in induced carcinoma in hamster's pouch. *Acta Cytol* 13: 94-98
57. Hayama FH, Motta ACF, de Padua AGS, Migliari DA (2005) Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 10: 115-122
58. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K (2006) Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol* 42: 461-474
59. Hopp ES (1958) Cytologic diagnosis and prognosis in carcinoma of the mouth, pharynx and nasopharynx. *Laryngoscope* 68: 1281-1287

60. Horowitz AM, Drury TF, Goodman HS, Yellowitz JA (2000a) Oral pharyngeal cancer prevention and detection. Dentists` opinions and practices. J Am Dent Assoc 131: 453-462
61. Horowitz AM, Drury TF, Canto MT (2000b) Practices of Maryland dentists: oral cancer prevention and early detection – baseline data from 1995. Oral Dis 6: 282-288
62. Howaldt HP, Kainz M, Euler B, Vorast H (1999) Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. DÖSAK. J Craniomaxillofac Surg 27: 275-288
63. Howell LP, Davis RL, Belk TI, Agdigos R, Lowe J (1998) The AutoCyte preparation system for gynecologic cytology. Acta cytol 42: 171-177
64. Hullmann M, Reichert TE, Dahse R, von Eggeling F, Pistner H, Kosmehl H, Driemel O (2007) Orale Zytologie – Historische Entwicklung, aktueller Stand und Ausblick. Mund Kiefer GesichtsChir 11: 1-9
65. Ingram RC, Krantz S, Mendeloff J (1963) Exfoliative cytology and the early diagnosis of oral cancer. Cancer 16: 160-165
66. Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman PA (1994) The Cytobrush plus cell collector in oral cytology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 77: 101-104

67. Kerl J, Ross A, Hilgarth M (1991) Cytobrush-Qualitätssicherung bei endozervikalen Abstrichen. Geburtshilfe Frauenheilkd 51: 51-53
68. King OH (1963) Intraoral exfoliative cytology technics. Acta Cytol 7: 327-329
69. Kowalski LP, Carvalho AL (2001) Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. Oral Oncol 37: 94-98
70. Krahel D, Altenburg A, Zouboulis C (2008) Reactive hyperplasias, precancerous and malignant lesions of the oral mucosa. JDDG 6: 217-232
71. Kujan O, Glenny AM, Duxbury J, Thakker N, Sloan P (2005) Evaluation of screening strategies for improving oral cancer mortality: a Cochrane systematic review. J Dent Educ 69: 255-265
72. Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P (2006) Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: Results from a cohort of normal oral mucosa. Oral Oncol 42: 810-818
73. Kurzwinski T, Deery A, Dooley J, Dick R, Hobbs K, Davidson B (1992) A prospective controlled study comparing brush and bile exfoliative cytology for diagnosing bile duct strictures. Gut 33: 1675-1677
74. Levine TS, Njemenze V, Cowpe JG, Coleman DV (1998) The use of PAPNET automated cytological system for the diagnosis of oral squamous carcinoma. Cytopathology 9: 398-405

75. Lind PO (1987) Malignant transformation on oral leukoplakia. Scand J Dent Res 95 : 449-455
76. Maraki D, Becker J, Böcking A (2004) Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. J Oral Pathol Med 33: 398-404
77. Maraki D, Hengge UR, Becker J, Böcking A (2006) Very early cytological and DNA-cytometric diagnosis of in situ carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. J Oral Pathol Med 35: 58-60
78. Martin-Hirsch P, Jarvis G, Kitchener H, Lilford R (2003) Collection devices for obtaining cervical cytology samples. Cochrane Database Syst Rev 2000: CD001036
79. McGoogan E, Reith A (1996) Would monolayers provide more representative samples and improved preparations for cervical screening? – Overview and evaluation of systems available. Acta Cytol 40: 107-119
80. Mehrotra R, Singh MK, Pandaya S, Singh M (2008) The use of an oral brush biopsy without computer-assisted analysis in the evaluation of oral lesions: a study of 94 patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 106: 246-253

81. Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, Koscielny S, Wiesner A, Bogumil R, Moller U, Osterloh D, Halbhuber KJ, Eggeling von F (2003) Biomarker discovery and identification in laser microdissected head and neck squamous cell carcinoma with ProteinChip technology, two-dimensional gel electrophoresis, tandem mass spectrometry, and immunohistochemistry. *Mol Cell Proteomics* 2: 443-452
82. Metzler P, Mollaoglu N, Schwarz S, Neukam FW, Nkene E, Riese J (2009) *MAGE-A* as a novel approach in the diagnostic accuracy of oral squamous cell cancer: a case report. *Head & Neck Oncology* 1: 39
83. Montgomery PW, von Haam E (1951) A study of the exfoliative cytology in patients with carcinoma of the oral mucosa. *J Dent Res* 30: 308-313
84. Morrison LF, Hopp ES, Wu R (1949) Diagnosis of malignancy of the nasopharynx. Cytological studies by the smear technic. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 58: 18-32
85. Morton TH, Cabay RJ, Epstein JB (2007) Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: report of three cases. *J Oral Pathol Med* 36: 315-318
86. Murata PJ, Johnson RA, McNicoll KE (1990) Controlled evaluation of implementing the cytobrush technique to improve Papanicolaou smear quality. *Obstet Gynecol* 75: 690-695

87. Murrah VA, Batsakis JG (1994) Proliferative verrucous leukoplakia and verrucous hyperplasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 103: 660-663
88. Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, Gandolfo S (2007) The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology* 18: 356-60
89. Neville BW, Day TA (2002) Oral Cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 52: 195-215
90. Nichols ML, Quinn FB, Schnadig VJ, Zaharopoulos P, Hokanson JA, Des Jardins L, McCracken MM (1991) Interobserver variability in the interpretation of brush cytologic studies from head and neck lesions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 1350-1355
91. Nicotera G, Gnisci F, Bianco A, Angelillo IF (2004) Dental hygienists and oral cancer prevention: knowledge, attitudes and behaviors in Italy. *Oral Oncol* 40: 638-644
92. Ogden GR, Cowpe JG, Green M (1992) Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A Comparison. *Acta Cytol* 36: 706-710
93. Ogden GR, Cowpe JG, Chisholm DM, Lane EB (1994) DNA and keratin analysis of oral exfoliative cytology in the detection of oral cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 30B: 405-408

94. Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ (1997) Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. J Oral Pathol Med 26: 201-205
95. Papanicolaou GN (1942) A new procedure for staining vaginal smears. Science 95: 438-439
96. Papanicolaou GN, Traut HF (1943) Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear, The Commonwealth Fund, New York, S 1-47
97. Pape HD (1972) Die Früherkennung der malignen Mundschleimhauttumoren unter besonderer Berücksichtigung der exfoliativen Cytologie, Hanser, München, S 1-135
98. Pape HD, Gerlach KL (1995) Tumorchirurgie. Tumoroperationen der unteren Mundhöhlenetage. In: Hausamen JE, Machtens E, Reuther J (Hrsg) Kirschnersche allgemeine und spezielle Operationslehre, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Springer, Berlin Heidelberg New York, S 474-498
99. Paula de AM, Carvalhais JN, Domingues MG, Barreto DC, Mesquita RA (2000) Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. J Oral Pathol Med 29: 477-482
100. Peters H, Rysinghani K (1956) The cytologic interpretation of the mouth smear. J Indian Med Assoc 27: 231-236

101. Poate TWJ, Buchanan JAG, Hodgson TA, Speight PM, Barrett AW, Moles DR, Scully C, Porter SR (2004) An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist oral unit. *Oral Oncol* 40: 829-834
102. Pomeranz MJ, Stahl SS (1953) A correlative study of cytodiagnosis and biopsy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 6:1026-1031
103. Potter TJ, Summerlin DJ, Campbell JH (2003) Oral malignancies associated with negative transepithelial brush biopsy. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 674-677
104. Ralhan R, Agarwal S, Nath N, Mathur M, Wasylyk B, Srivastava A (2001) Correlation between p53 gene mutations and circulating antibodies in betel- and tobacco-consuming North Indian population. *Oral Oncol* 37: 243-250
105. Ramaesh MT, Ratanatunga TN (1998) Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 27: 83-86
106. Ramos DM, Chen B, Regezi J, Zardi L, Pytela R (1998) Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 75: 680-687
107. Ranasinghe AG, Maceoch C, Dyer S, Spurr N, Johnson NW (1993) Some oral carcinomas from Sri Lankan betel/tobacco chewers overexpress p53 oncoprotein but lack mutations in head and neck cancer. *Anticancer Res* 13: 2065-2068

108. Regezi JA, Ramos DM, Pytela R, Dekker NP, Jordan RC (2002) Tenascin and beta 6 integrin are overexpressed in floor of mouth in situ carcinomas and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 38: 332-336
109. Reibel J (2003) Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 14: 47-62
110. Reichart PA (2000) Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol* 28: 390-398
111. Reichart PA (2007) Orale Leukoplakie/Erythroplakie. Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK). *Dtsch Zahnärztl Zeitschr* 62: 45-48
112. Reichart PA, Philipsen HP (2005) Oral erythroplakia - a review. *Oral Oncol* 41: 551-561
113. Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Böcking A (2001) Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 22: 211-221
114. Remmerbach TW, Weidenbach H, Müller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B, Böcking A (2003) Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol* 25: 139-146

115. Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A (2004) Nichtinvasive Bürstenbiopsie als innovative Methode in der Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms. Mund Kiefer Gesichtschir 8: 229-236
116. Remmerbach TW, Meyer-Ebrecht D, Aach T, Würflinger T, Bell AA, Schneider TE, Nietzke N, Frerich B, Böcking A (2009) Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer. Cancer (Cancer cytopathol) 117: 228-235
117. Rich AM, Kerdpon D, Reade PC (1999) p53 expression in oral pre-cancer and cancer. Aust Dent J 44: 103-105
118. Rick GM, Slater L (2003) Oral brush biopsy: The problem of false positives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 96: 252
119. Roth D, Hayes RL, Ross NM, Gitman L, Kissin B (1972) Effectiveness of acridine-binding method in screening for oral, pharyngeal, and laryngeal cancer. Cancer 29: 1579-1583
120. Salley JJ (1954) Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster. J Dental Res 33: 253-262
121. Sandler H, Freund HR, Stahl SS (1959) Exfoliative cytology applied to the detection and treatment of head and neck cancer. Surgery 46: 479-485

122. Sandler HC, Stahl SS, Cahn LR, Freund HR (1960) Exfoliative cytology for detection of early mouth cancer. *Oral Surg* 13: 994-1009
123. Sandler H (1962) Cytological screening for early mouth cancer. *Cancer* 15: 1119-1124
124. Sandler H (1964) The cytologic diagnosis of tumors of the oral cavity. *Acta Cytol* 8: 114-120
125. Sankaranarayanan R, Mathew B, Jacob BJ, Thomas G, Somanathan T, Pisani P, Pandey M, Ramadas K, Najeeb K, Abraham E (2000) Early findings from a community-based, cluster-randomized, controlled oral cancer screening trial in Kerala, India. The Trivandrum Oral Cancer Screening Study Group. *Cancer* 88: 664-673
126. Sankaranarayanan R, Fernandez Garrote L, Leuce Anta J, Pisani P, Rodriguez Salva A (2002) Visual inspection in oral cancer screening in Cuba: a case-control study. *Oral Oncol* 38:131-136
127. Scheifele C, Reichart PA (2003) Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? *Oral Oncol* 39: 470-475
128. Scheifele C, Schlechte H, Bethke G, Reichart PA (2002) Nachweis von TP53-Mutationen mittels Exfoliativzytologie (brush biopsy) oraler Leukoplakien. *Mund Kiefer GesichtsChir* 6: 410-414

129. Scheifele C, Schmidt-Westhausen AM, Dietrich T, Reichart PA (2004) The sensitivity and specificity of the OralCDx technique. *Oral Oncol* 40: 824-828
130. Schleier P, Zenk W, Dietel W (2002) Fluoreszenz beim Mundhöhlenkarzinom. *HNO-Nachrichten* 5: 22-24
131. Schneider G (1952) Krebserkennung und Zytodiagnostik. *Dtsch Zahnarztl Z* 7: 1127-1143
132. Sciubba JJ (1999) Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. *JADA* 130: 1445-1457
133. Sciubba JJ (2001) Oral cancer and its detection - History-taking and the diagnostic phase of management. *JADA* 132: 12S-18S
134. Scott IS, Odell E, Chatrath P, Morris LS, Davies RJ, Vowler SL, Laskey RA, Coleman N (2006) A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Br J Cancer* 94: 1170-1175
135. Selbach GJ, von Haam E (1963) The clinical value of oral cytology. *Acta Cytol* 7: 337-345
136. Sen S (2000) Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* 12: 82-88

137. Shahnava SA, Regezi JA, Bradley G, Dube ID, Jordan RC (2000) p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *J Pathol* 190: 417-422
138. Shapiro BL, Gorlin RJ (1964) An analysis of oral cytodiagnosis. *Cancer* 17: 1477-1479
139. Shklar G, Cataldo E, Mever I (1970) Reliability of cytologic smear in diagnosis of oral cancer. *Arch Otolaryngol* 91: 158-160
140. Silverman S (1988) Early diagnosis of oral cancer. *Cancer* 62: 1796-1799
141. Silverman S, Becks H, Farber SM (1958) Diagnostic value of intraoral cytology. *J Dent Res* 37: 195-205
142. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F (1984) Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 53: 563-568
143. Spafford MF, Koch WM, Reed AL, Califano A, Xu LH, Eisenberger CL, Yip L, Leong PL, Wu L, Liu SX, Jerónimo C, Westra WH, Sidransky D (2001) Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res* 7: 607-612
144. Staats OJ, Goldsby JW (1963) Graphic comparison of intraoral exfoliative cytology technics. *Acta Cytol* 7: 107-110

145. Stahl SS (1963) Exfoliative cytology in an experimentally induced carcinoma of the hamster cheek pouch. *Acta Cytol* 7: 262-267
146. Suhr MA, Hopper C, Jones L, George JG, Bown SG, MacRobert AJ (2000) Optical biopsy systems for the diagnosis and monitoring of superficial cancer and precancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 29: 453-457
147. Svirsky JA, Burns JC, Carpenter WM, Cohen DM., Bhattacharyya I, Fantasia JE, Lederman DA, Lynch DP, Sciubba JJ, Zunt SL (2002) Comparison of computer-assisted brush biopsy results with follow up scalpel biopsy and histology. *Gen Dent* 50: 500-503
148. Teppo H, Koivunen P, Hyrynkangas K, Alho OP (2003) Diagnostic delay in laryngeal carcinoma: professional diagnostic delay is a strong independent predictor of survival. *Head Neck* 25: 389-394
149. Tiecke RW, Kendrick FJ (1961) Smear techniques in the diagnosis of intra-oral carcinoma. *Dent Prog* 1: 192-198
150. Tiecke RW, Blozis GG (1966) Oral Cytology. *JADA* 72: 855-861
151. Tiitta O, Happonen RP, Virtanen I, Luomanen M (1994) Distribution of tenascin in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 23: 446-450

152. Tischendorf L (2005) Impressionen vom Symposium „Mundschleimhauterkrankungen und Präkanzerosen – Was muss der Praktiker wissen? Wie geht der Praktiker damit um?“ am 13. November 2004 in Essen. Dens. Mittbl Zahnärztekammer Mecklenburg-Vorpommern 5: 27-28
153. Trimpos JB, Arentz NPW (1986) The efficiency of the cytobrush versus the cotton swab in the collection of endocervical cells in cervical smears. Acta Cytol 30: 261-263
154. Umiker W, Lampe I, Rapp R, Latourette H, Boblitt D (1959) Irradiation effects on malignant cells in smears from oral cancers. Cancer 12: 614-619
155. Van der Waal I, Reichart PA (2008) Oral proliferative verrucous leukoplakia revisited. Oral Oncol 44: 719-721
156. Vassilakos P, Cossali D, Albe X, Alonso L, Hohener R, Puget E (1996) Efficacy of monolayer preparations for cervical cytology – Emphasis on suboptimal specimens. Acta Cytol 40: 496-500
157. Wahi PN, Gupta KJ (1954) Exfoliative cytology in the diagnosis of carcinoma of the oral cavity. J Indian Med Assoc 23: 425-427
158. Warnakulasuriya S, Soussi T, Maher R, Johnson N, Tavassoli M (2000) Expression of p53 in oral squamous carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. J Pathol 192: 52-57

159. Watanabe Y (1968) Methods for early diagnosis of oral tumours: oral cytology. Inter Dent J 18: 708-723
160. Weinmann J (1940) The keratinization of the human oral mucosa. J Dent Res 19: 57
161. Wildt J, Bongaard T, Bentzen SM (1995) Delay in the diagnosis of upper aerodigestive tract carcinoma. Clin Otolaryngol 20: 21-25
162. Witte S (1970) Gastro-Camera examination and aimed gastric biopsy. Dtsch Med Wochenschr. 7;95(32):1659
163. Witte S (1973) Die exfoliative Zytologie im Gastrointestinaltrakt. Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für Pathologie 57 : 126-137
164. Zain RB (2001) Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer – a brief overview. Oral Oncol 37 : 205-210
165. Zenk W, Dietl W, Schleier P, Günzel S (1999) Visualisierung von Karzinomen der Mundhöhle und Stimulierung der Synthese von fluoreszierendem Protoporphyrin IX. Mund Kiefer Gesichtschir 3 : 205-209
166. Ziskin DE, Kamen P, Kitley I (1941) Epithelial smears from oral mucosa. J Dent Res 20: 386-387

167. Ziskin DE, Moulton R (1948) A Comparison of oral and vaginal epithelial smears. J Clin Endocrin 8: 146-165

168. Zunt SL (2001) Transepithelial Brush Biopsy: an adjunctive diagnostic procedure. J Indiana Dent Assoc 80: 6-8

DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle soll allen gedankt werden, die durch ihren Einsatz an dem Gelingen dieser Arbeit ihren Anteil hatten:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Torsten E. Reichert, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Regensburg, für die Möglichkeit, die Arbeit mit den Ressourcen seiner Abteilung erstellen zu dürfen, sowie wesentliche Anregungen und Bereicherungen der Arbeit durch seine verständnisvolle Kritik.

Herrn Privatdozenten Dr. med. Dr. med. dent. Oliver Driemel, externer Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Regensburg, für die gute Betreuung und Anleitung während der Erstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Hartwig Kosmehl, Chefarzt des Institutes für Pathologie des HELIOS Klinikums Erfurt, und Herrn PD Dr. med. Stephan Schwarz, Institut für Pathologie der Universität Erlangen-Nürnberg, für die kompetente Auswertung der gewonnen zytologischen Präparate.

Frau Anja Reck, MTA der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Regensburg, gilt besonderer Dank für die technische Assistenz und ihr Engagement bei der Aufbereitung der Proben.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Regensburg, die die praktische Durchführung der Probengewinnung unterstützten und zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Ebenso muss allen Patienten gedankt werden, die sich für die Gewinnung der Bürstenbiopsien zur Verfügung gestellt haben.

Lebenslauf von Markus Manuel Hullmann



- | | |
|--------------|--|
| 30.06.1977 | geboren in Essen (Nordrhein-Westfalen) als Sohn von Ingo und Ulrike Hullmann |
| 1983-1987 | Besuch der Von-Einem-Schule Essen, städtische Gemeinschaftsgrundschule für Jungen und Mädchen |
| 1987-1996 | Besuch der Helmholtz-Schule Essen, städtisches Gymnasium für Jungen und Mädchen mit Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife |
| 1996-1997 | Wehrdienst im Sanitätsdienst der Luftwaffe |
| 1997-2003 | Studium der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf |
| Oktober 2004 | Ärztliche Approbation |

2004-2008 Zweitstudium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg

Seit Januar 2008 Assistenzarzt in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätskliniken Regensburg

Mai 2008 Staatsexamen Zahnmedizin und Zahnärztliche Approbation